

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

# 目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

## 新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所・食品部

研究者 豊田正武

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 合田幸広、穉山 浩
- (2) ニッカウキスキー（株）生産技術研究所 庄司俊彦
- (3) カゴメ（株）総合研究所基礎研究部 猪熊隆博
- (4) 三栄源 FFI（株）品質保証部 大本俊郎
- (5) 東京大学大学院農学生命科学研究科 上野川 修
- (6) 東京大学大学院薬学系研究科 海老塚 豊

食品化学的特性として、抗アレルギー性及び抗高脂血症性に的を絞り、ニンジン果汁投与によるマウスの特異的 IgE 抗体産生抑制機構の解明、リンゴポリフェノールの成分間の相乗作用による *in vivo* 抗アレルギー活性の解明、アントシアニン類の抗アレルギー活性評価、遺伝子導入マウスを用いた食品アレルギー免疫応答の解析、遺伝子導入マウスを用いた食品中の成分の抗アレルギー活性の検討、サトイモ中の抗高脂血作用成分の解明を行った。

### 1. 研究目的

食品には、栄養機能、感覚機能の他に、第三の機能と言うべき体調節機能があることが知られるようになってきた。近年、この体調節機能に的を絞った食品の開発が始まり、この新機能素材を求め、食品の化学的特性を解明する研究が行われつつある。本研究では、食品化学的特性として、抗アレルギー性と高脂血症性を対象とし、その解析、評価を行う。種々の食品には、アレルギー反応を起こすアレルゲンが含まれていることは良く知られた事実だが、これまでの研究から、逆にアレルギー作用を低減化する作用を持つ食品や食品素材があることも明かになっている。従って、このような食品及び食品素材を明かにし、さらに、その活性成分及び作用を解明、解析することで、食品のもつダイナミックな体調節作用を明かにできる。また、解明された抗アレルギー食品、食品成分を積極的に摂取することで、アレルギー症状の改善をはかれることになる。高脂血症も、アレルギーとともに深刻な社会問題となっている病気のひとつである。本研究では、メバロン酸経路の後期段階の酵素反応であるラノステロール合成酵素反応に標的を絞り、食品及び食品素材の持つ抗高脂血症作用を評価する系の開発を行い、食品のもつ新たな食品化学的特性の解明を行う。

### 2. 研究方法

#### 2.1 ニンジンの食品化学特性（抗アレルギー作用）の解析と評価

雌性 BALB/c マウス（7 週齢）に飲水に換えてニンジンジュースを 2 週間自由摂取させた。脱血致死させたマウスより、脾臓、および腸間膜リンパ節を採取しガラス製ホモジナイザーを用いて細胞懸濁液を調製した。FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) を用いて細胞膜を固定後、FITC labeled anti-mouse CD90.2(Thy1.2) (T 細胞マーカー) および、PE labeled anti-mouse CD45R/B220 (B 細胞マーカー) または、FITC labeled anti-mouse CD4(L3T4) (CD4 陽性細胞) および、PE labeled anti-mouse 8a(Ly-2) (CD8 陽性細胞) を添加し、細胞を染色後、フローサイトメーター (FACScaliber, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) を用いてリンパ球組成を測定した。

#### 2.2 リンゴポリフェノールの食品化学特性（抗アレルギー作用）の解析と評価

リンゴ未熟果由来ポリフェノール (ACT) の重合度別画分の溶液 (画分溶液) を仔ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液と混和し 37 °C で反応させた後、過塩素酸を添加してタンパクを取り除いた。画分溶液と BSA 溶液にも同様の操作を行い、それぞれの 280 nm の紫外吸収を測定してタンパク結合能を算出した。また、HPLC による同定が容易で二量体の主要成分である Procyanidin B2 (PB2) を指標に、二量体と他の画分の共存下におけるタンパク結合性の変化を検討した。すなわち、二量体画分と他の画分を混和し、さらにこれを BSA 溶液と混和した後、タンパクを固相抽出カラム (Empore™, High Performance Extraction Disk

Cartridge, C18-SD) を用いて取り除いた。除タンパク後の溶液中の PB2 を HPLC (移動相: (MeOH : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH) = (20 : 80 : 0.2), 検出器: 電気化学検出器 ESA Coulochem II, Column: YMC-pack ph A-403) を用いて定量し、結合率を算出した。in vivo における相乗効果を確認するために、各画分より再構築した ACT (rcACT)、二量体画分 (Dimer)、および、再構築において二量体を除いた ACT (rcACT-Dimer) の活性を、I 型アレルギーモデルマウス用いて比較した。雌性 BALB/c マウス 7 週齢の pristane (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane) を腹腔内に投与し、5 日後に耳介後部に DNP-IgE を産生する IGEL a2 細胞 (2 x 10<sup>6</sup> cells/500 μL) を移植した。細胞移植 10 日後、各サンプルを経口投与し、その 2 時間後にハプテン抗原として塩化ピクリル (4%アセトン溶液) を耳介に塗布した。経時的に耳介の肥厚を測定し、ハプテン塗布直前の耳介肥厚をもとに腫脹を算出した。なお、positive control として Ketotifen (0.2 mg/mouse) および、ACT (10 mg/mouse) を投与した。

### 2.3 アントシアニン類の抗アレルギー活性評価

昨年度までに同定されたアカダイコン由来の 11 種のアントシアニンについて、ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3 細胞) を用いてヒスタミン遊離抑制活性を測定した。すなわち、3 x 10<sup>6</sup> cell/500 μL/well で播種し一晩前培養した RBL-2H3 細胞に抗 DNP-IgE 抗体を添加し、90 分間培養後、各アントシアニンを最終濃度が 0.05、0.15、0.5 μmol/mL となるように添加した。直後、抗原として DNP-HSA を添加し 35 分間培養した後、反応を停止し、除タンパクした上清のヒスタミン濃度のポストカラム化 HPLC にて測定した。さらに比較的強い活性の認められた成分について、抗原添加時に誘導される Ca<sup>2+</sup>イオンの流入に対する影響を、Fura-2AM 標識した RBL-2H3 細胞を用い、蛍光光度計 (日立、fluorescence spectrophotometer F-2500) で細胞内カルシウム濃度の変化を分析することで検討した。

### 2.4 遺伝子導入マウスを用いた食品アレルギー免疫応答の解析

卵アレルギーである卵白アルブミン (OVA) に特異的な T 細胞抗原レセプター (TCR) の遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (OVA23-3 マウス) を用いた。このマウスの TCR が認識する、OVA の 323-339 残基に相当するペプチド (OVA323-339; ISQAVHAAHAEINEAGR) の 1 アミノ酸残基置換アナログのうち、T 細胞応答を抗原特異的に抑制する活性 (TCR アンタゴニスト活性) をもつものを検索したところ、<sup>326</sup>Ala 残基を Val 残基あるいは Phe 残基に置換したペプチド A326V および A326F は強い TCR アンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。そこで、A326V を不完全フロイントアジュバント (IFA) とともにエマルジョンとしたものを、卵白食摂取開始の 7 日前および 1 日前に OVA23-3 マウスの腹腔に投与した。対照群として、OVA323-339 の 1 残基置換アナログのうち T 細胞応答に何の影響も与えないもの (H328Q) を同様に投与したものの、PBS を同様に投与したものの、卵白食摂取のみで無処理のものを設定した。卵白食摂取開始後、体重変化と臨床症状の観察を行うとともに、毎週マウス尾静脈から採血し、血清中の OVA 特異 IgE 抗体価を酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。小腸における組織学的変化は、各群の OVA23-3 マウスから小腸を取り出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋した後作製した切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、光学顕微鏡で観察した。

### 2.5 遺伝子導入マウスを用いた食品中の成分の抗アレルギー活性の検討

OVA23-3 マウスを利用した食品アレルギー反応モデルを用いて、食品中の成分の抗アレルギー活性を検討した。ここでは、母乳中に多く含まれ、様々な生理作用を示すことが知られているヌクレオチドに着目し、それが CD4 陽性ヘルパー T 細胞の Th1/Th2 バランスにどのような影響を与えるかについて検討した。ここで Th1 とはインターフェロン γ (IFN-γ) を高産生する 1 型ヘルパー T 細胞であり、Th2 とは主にインターロイキン 4 (IL-4) を高産生する 2 型ヘルパー T 細胞である。抗原に未感作な T 細胞は、抗原刺激を受けるときの様々な条件によって Th1、あるいは Th2 へ分化することが知られている。アレルギー反応に対し Th1 型の応答は抑制的に働き、Th2 は促進的に働くと考えられている。

母乳とほぼ同じ組成のヌクレオチドを 0.4% 添加した飼料 (NT(+)) または、ヌクレオチド無添加の飼料 (NT(-)) を、離乳直後 (3 週齢) の OVA23-3 マウスに 2% OVA 水溶液投与下で自由摂取させた。OVA23-3 マウスの採血は、摂取開始後 2、4 および 6 週間後に行い、血清中の OVA 特異的 IgG1、IgG2a、および IgE 抗体価を ELISA 法により測定した。また、4 週間後に脾臓細胞を調製し、OVA の存在下で培養し、上清中のサイトカイン (IFN-γ および IL-4) の濃度を ELISA 法により測定した。また、脾臓細胞および腹腔浸出液中マクロファージの IL-12 産生も測定した。培養上清中の IL-12 量の測定はバイオアッセイ法により行った。

### 2.6 サトイモ中の抗高脂血作用成分の解明

昨年度、60 種の野菜のエタノール抽出物についてヒト由来ラノステロール合成酵素及び、[<sup>14</sup>C] 標識オキシドスクアレンを用いたインビトロアッセイ法によりスクリーニングをした結果、サトイモのエタノール

抽出物が強い同酵素阻害活性を示した。そこで本年度は、サトイモ中に含まれるラノステロール合成酵素阻害活性を有する成分について同アッセイ法での酵素阻害活性を指標として、詳細な検討を行った。8品種のサトイモのエタメール抽出物について阻害活性を検討し、その中で強い活性を有するものについて大量抽出を行い、得られた抽出物について各種クロマトグラフィーを用い分画、含有される活性成分を単離、その構造を決定した。

### 3. 研究成果

#### 3.1 ニンジン食品化学特性（抗アレルギー作用）の解析と評価

正常 BALB/c マウスとニンジン果汁投与マウスの間に、脾臓中の T 細胞、B 細胞、CD4 陽性細胞、および、CD8 陽性細胞の組成比は、有意な差が認められなかった。一方、ニンジン果汁を投与したマウスの腸間膜リンパ節では正常マウスのそれと比べ、リンパ球に対する T 細胞の組成比の減少（正常  $65.4 \pm 0.8\%$  がニンジン投与で  $56.8 \pm 2.6\%$ ）が認められ、B 細胞の組成比の増加（正常  $24.4 \pm 2.3\%$  がニンジン投与で  $28.4 \pm 1.3\%$ ）が認められた。また、CD4 陽性細胞および、CD8 陽性細胞のリンパ球に対する組成比も減少（それぞれ正常  $48.8 \pm 1.0\%$ 、 $18.3 \pm 1.2\%$ 、がニンジン投与で  $45.2 \pm 2.5\%$ 、 $16.0 \pm 1.0\%$ ）が認められたが、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比（正常  $2.69 \pm 0.22$  がニンジン投与で  $2.83 \pm 0.10$ ）に有意な変化は認められなかった。

#### 3.2 リンゴポリフェノールの食品化学特性（抗アレルギー作用）の解析と評価

これまでの検討により、リンゴ未熟果実より抽出された高分子ポリフェノール画分（リンゴ未熟果ポリフェノール（Apple Condensed Tannin）；ACT は、エピカテキンおよび、カテキンをユニットとする重合体成分の混合物であり（Fig. 1）、*in vitro* におけるヒスタミン遊離抑制活性や *in vivo* における I 型アレルギーマウス耳介肥厚試験抑制作用が見い出されてきた。そこで、これらを本研究グループで開発した n-hexane/methanol/ethyl acetate を移動相とする順相分取カラムクロマトグラフィー（文献 4）によって分画した。分取クロマトグラフィーの図と trimer 画分を逆相クロマトグラフィーで分析したものを Fig.2、trimer 画分中の成分について、本研究グループで開発した低温測定 NMR と LC/MS で厳密に構造決定したものを Table 1 に示す。このように各画分とも重合度が同一で、ユニット間の結合位置、ユニットが一部異なる多成分系である。この様な重合度に基づいて分画した画分を用い、その抗アレルギー活性を検討したところ、*in vivo* において、各画分の活性は ACT に比べ弱く、ACT の抗アレルギー活性が単一の画分に依存する活性ではなく、各画分間の相乗作用に依存すると推測された。そこで、比較的重合度の低い低分子画分と重合度の大きな高分子画分の相乗効果によって成立する、すなわち、高分子画分が、低分子画分のタンパクとの結合や会合を阻害することで、低分子のプロシアニジンの遊離体を増加させ、その結果、ACT としての *in vivo* での活性が示される、と推測した。このような仮説を証明するため、重合度により分画した各画分のタンパク結合性について検討した。その結果、重合度が増すに従って、タンパク結合性が大幅に上昇することが明らかになった。また、2 量体画分と他の重合度の画分を共存させた場合、共存させた画分の重合度の増加に伴って、すなわち、共存する画分のタンパク結合能が上昇するに従って遊離状態の PB2（二量体の主成分）の濃度が上昇した。さらに、Dimer 画分中のものと比較し、再構築した ACT 中の PB2 はほとんど、遊離していることが判明した（Fig. 3）。さらに、ACT、再構築 ACT（rcACT）、再構築した ACT から二量体画分を除いたもの（rcACT-Dimer）、二量体画分について耳肥厚抑制活性を比較したところ、ACT 投与群、rcACT 群のマウスでは耳介の腫脹が抑制されたのに対し、Dimer 群、rcACT-Dimer 群のマウスでは有意な腫脹の抑制は認められなかった（Fig. 4）。

#### 3.3 アントシアニン類の抗アレルギー活性評価

RR-A は  $0.05 \mu\text{mol/mL}$  から  $0.5 \mu\text{mol/mL}$  の範囲で濃度に依存したヒスタミン遊離抑制活性を示し、 $0.5 \mu\text{mol/mL}$  で、ketotifen ( $0.047 \mu\text{mol/mL}$ ) と同等の活性を示した（Fig. 2）。同様の検討を行ったところ 11 種類のアントシアニンのなかで、RR-A、RR-B0、RR-C、RR-G に  $0.5 \mu\text{mol/mL}$  でそれぞれ 60%、40%、20%、28%の RBL-2H3 細胞からのヒスタミン遊離抑制活性が認められた。他の成分の阻害活性は、 $0.5 \mu\text{mol/mL}$  において、20%未満であった。また、抗原添加後のカルシウム濃度を上昇は、RR-A の添加により見かけ上抑制されるが、ionomycin calcium の添加により、完全なカルシウム流入を誘導しても、細胞内カルシウム濃度に差が認められた。

#### 3.4 遺伝子導入マウスを用いた食品アレルギー免疫応答の解析

卵白食摂取のみの群（摂取量は 1 匹あたり一日 OVA として約 200 mg）、H328Q 投与群、PBS 投与群では、卵白摂取開始後から体重の減少が認められた。体重減少は 3~4 週間目まで続き、その後増加に転じ、8 週間目でほぼ回復した。一方、A326V 投与群では、そのような体重の減少は認められなかった。

また、3つの対照群では、複数のマウス個体に下痢の症状が認められ、各群それぞれ一匹ずつ症状の悪化に伴う死亡個体があった。一方、A326V投与群では、軽度の下痢を示した個体は認められたものの、ひどい下痢症状を示した個体、死亡した個体はなかった。長期間の卵白食摂取による血清中のOVA特異IgE抗体価は、A326V投与群では、PBS投与群、H328Q投与群と比較して低下する傾向が認められた。また、腸管における組織学的変化は、A326V投与群では認められなかった。以上の結果より、OVA23-3マウスのT細胞に対してTCRアンタゴニスト活性を示すA326Vは、本研究で用いたin vivoにおける食品アレルギー反応モデルにおいて、アレルギー抑制効果を示すことが明らかとなった。

### 3.5 遺伝子導入マウスを用いた食品中の成分の抗アレルギー活性の検討

2%OVA水溶液投与下、NT(-)食あるいはNT(+食)を4週間自由摂取させたOVA23-3マウスの脾臓細胞を調製し、100 µg/mlのOVA存在下で48時間培養した。培養上清中のIFN-γおよびIL-4量をELISA法にて測定したところ、IFN-γ産生は、NT(+食)群がNT(-)食群に比べて有意に高かった。一方、IL-4産生は、両群間で有意な差は見られなかったものの、NT(+食)群で低下する傾向が見られた。なお、OVA非存在下での培養上清からは、IL-4およびIFN-γは検出されなかった。以上の結果からヌクレオチドの経口摂取はTh1型のサイトカイン産生応答を増強することが示されたため、さらにマクロファージ、樹状細胞などが産生し、T細胞のTh1への分化を促進する働きを示すサイトカインであるIL-12の産生への影響を検討した。OVA23-3マウスの脾臓細胞および腹腔マクロファージを調製し、その培養上清中の活性型IL-12産生能をバイオアッセイ法で検討した。IL-12のバイオアッセイ法は、IL-12p70が脾臓細胞のIFN-γ産生能を誘導することによって測定する方法である。その結果、脾臓細胞のIL-12活性は、NT(+食)群の方がNT(-)食群に比べて有意に高かった。さらに、LPS(0.1または1 µg/ml)刺激下で培養した滲出性の腹腔マクロファージのIL-12活性もまた、NT(+食)群の方がNT(-)食群に比べて有意に高かった。次にOVAの経口摂取により血清中に誘導されるOVA特異抗体の産生に与える経口摂取ヌクレオチドの影響を検討した。2%OVA水溶液投与下、NT(-)食あるいはNT(+食)を2週間あるいは4週間自由摂取させたOVA23-3マウスから血清を調製し、OVA特異的な抗体価を測定した。その結果、NT(+食)群では、NT(-)食群に比べ、血清中のOVA特異的なIgE抗体価が、有意差は見られないものの低下する傾向が見られた。また、どちらも有意差は見られなかったが、血清中のOVA特異的なIgG1抗体価は低下し、IgG2a抗体価は高くなる傾向が認められた。水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとしてOVAをBALB/cマウスに投与した場合に誘導されるOVA特異抗体価に対するヌクレオチド経口摂取の効果を見た別な実験では、NT(+食)群で有意にOVA特異IgE抗体価が低下するという結果が得られている。また、IgG1、IgG2aにおいては有意差は認められなかったものの、基本的に上記と同様の結果であった。IgG1、IgEの産生はともにTh2型のサイトカインによって促進され、逆にIgG2aはTh1型のサイトカインによって抑制されることから、この結果も、ヌクレオチドの経口摂取がTh1型のサイトカイン産生応答を増強することを支持するものと考えられる。また、抗原特異的IgE抗体価の低下が認められたことから、ヌクレオチドの経口摂取はアレルギーに対して実際に抑制的に働くことが示唆された。

### 3.6 サトイモ中の抗高脂血作用成分の解明

サトイモ凍結乾燥体、a; 八名丸(福島県)、b; 愛知早生(愛知県)、c; ぜんこうじ(栃木県壬生町)、d; 会津土垂(福島県北会津村)、e; 石川早生(愛知県)、f; 土垂(千葉県)、g; オオイモ(福島県表郷)、h; 八つ頭(茨城県)の8品種のエタノール抽出物(600 µg)について活性を確認した。その結果、8品種のサトイモの中で愛知早生(愛知県産)、八つ頭(茨城県産)のエタノール抽出物が比較的強い酵素阻害活性を有していることが判明した。そこで「愛知早生」のエタノール抽出物に含まれる活性成分についての検討を行った。エタノール抽出物をFig 5. に示す分配操作により分画、得られた各抽出物についての阻害活性を確認した。次いで、活性の見られたhexane ext. 1(250 mg)、hexane ext. 2(550 mg)をシリカゲルカラムによりTLCのスポットを指標として分画し、各画分について同様のアッセイを行ったところ、ext.2の画分Dに比較的強い活性が、Gに強い活性がみられた。画分D及びGについてHPLCを用い分析を行ったところ、それぞれ複数の成分の混合物であることが明らかとなった。そこでまず、混合物の状態でもNMR及LC/MSを測定したところ、混合物は同一の骨格をもつ化合物群で構成されていることが判明し、その基本構造をそれぞれmonogalactosyldiacylglycerol及びdigalactosyldiacylglycerolと決定した。さらに分取HPLCにより各分画を単離、NMR、HR-MSにより各化合物が構造内に含む脂肪酸の種類を特定した(Fig. 6)。さらに得られた7種の化合物の酵素阻害活性を測定したところ、画分Dから単離したmonogalactosyldiacylglycerolで、300 µg/mLの濃度で28-36%、画分Gから単離したdigalactosyldiacylglycerolで41-67%の阻害活性が見られた。

## 4.考察

### 4.1 ニンジンの食品化学特性（抗アレルギー作用）の解析と評価

ニンジン果汁を投与することによって、脾臓ではなく、腸間膜リンパ節において、リンパ球組成の変動がみられたことは、ニンジン果汁の抗アレルギー活性が、成分の直接的な全身免疫系への作用ではなく、消化管免疫系への影響を介した全身免疫系の制御する可能性を示唆している。消化管免疫系から全身免疫系への制御については、食物由来抗原についての経口免疫寛容以外は知見が少なく、パイエル板、および、腸管上皮間リンパ球組成について、同様の検討を行い、消化管免疫系と全身免疫系の相互作用について解明する必要がある。また、腸間膜リンパ節の変化が、ニンジン果汁の成分に直接由来するのか、腸内細菌叢の変化などを介したものであるか検討する必要がある。

### 4.2 リンゴポリフェノールの食品化学特性（抗アレルギー作用）の解析と評価

様々な重合度のプロシアニジンの混合物である ACT が抗アレルギー活性を発現する際に、比較的重合度の大きなプロシアニジンが、重合度の小さなプロシアニジンとタンパクとの結合や会合を阻害することで、重合度の低いプロシアニジンの遊離量を増加させ、結果として ACT の *in vivo* での強い抗アレルギー活性が発現するという仮説を考えた。この仮説を証明する第一歩として、ACT の重合度とタンパク結合性の関係について検討したところ、重合度と結合指数の間に正の相関が認められることが明らかとなった。昨年度までの研究で、*in vitro* における各画分のヒスタミン遊離抑制活性は、各画分の重合度と正の相関を示すことが明らかになっている。また、化学合成した重合体を用いた実験で、重合度の上昇に伴い、抗潰瘍活性及びタンパク結合性が共に上昇することが報告されている。今回の結果は、これらの報告と矛盾せず、ACT の重合度によって、細胞膜上に存在するタンパク質との結合性に相違が生じることで、各画分の見かけの活性が変化する可能性が示唆された。Fig.3 に示したように ACT 中の PB2 の遊離量が 2 量体画分中での PB2 の遊離量に比べ著しく増加したことから、生体内では ACT 中の低分子プロシアニジンの遊離が大きく促進されていることが予想される。さらに、Fig.4 に示した *in vivo* における試験の結果から、単独では有意な活性を持たない Dimer 画分が、他のより分子量の大きいオリゴマーと共存すると、相乗的な作用に結果、有意な活性を示すことが明らかとなった。よって、*in vitro* では低分子に強い活性が存在するのに係わらず、*in vivo* では、高分子を主成分とする ACT に強い活性が存在する矛盾並びに、ACT を分画し *in vivo* の活性を測定すると、どの画分も ACT より強い活性を示すことがないという矛盾を合理的に説明することが可能となった。今回の実験では、画分ごとの実験で、RBL-2H3 細胞からのヒスタミン遊離抑制活性並びに耳肥厚抑制活性が最も強い、Dimer 画分を、活性本体と考え、実験を行っている。しかし、Fig.4 をより詳しくみると、ACT-dimer を投与したマウスでは、耳介肥厚は、Control 群に対して有意ではないものの抑制作用を示していることが判る。そのため、ACT や rcACT を投与した群の耳介肥厚と、ACT-dimer を投与した群の耳介肥厚間では有意な差を認めることができなかった。よって、Dimer 画分の他にも、単独投与では活性を発現できないものの、ACT として投与された場合、その活性を発現する他の成分が存在する可能性が示唆された。これまでの研究から、今回検討していない単量体画分中、Epicatechin にある程度のヒスタミン遊離抑制活性が存在することが判明しており、同様の検討が必要と考えられる。また、単量体画分、2 量体画分を一つの画分と考え、それ以外の多量体画分との相乗作用についても、今後の検討が必要と考えられる。*In vivo* における抗アレルギー活性発現において、本研究で示した相乗作用がどの過程で作用しているかは、明らかになっていない。消化管において、相乗作用が作用し、吸収の効率が促進されている可能性や、吸収後、作用部位への到達の過程で作用していることが考えられる。我々のグループの別な研究から、マウスに経口投与されたリンゴポリフェノールのうち、単量体並びに PB2 は、ECD-HPLC 並びに LC/MS により、マウス血清中で検出されることが明らかになっており、ACT 投与時の血液中の各プロシアニジン類の挙動の解析が今後必要と考えられる。

### 4.3 アントシアニン類の抗アレルギー活性評価

アカダイコンのアントシアニン類は、pelargonidin (RR-B<sub>0</sub> では cyanidin) 3-O-sophoroside 5-O-glucoside を基本構造とするアシル化アントシアニンである。今回、検討した 11 種類のアントシアニンのうち、0.5 mmol/mL で 20%以上のヒスタミン遊離抑制活性を示した RR-A、RR-B<sub>0</sub>、RR-C、RR-G は、この基本構造に加え、B 糖の 2 位のアシル基が feruloyl 基であることが判明した。また、A 糖に feruloyl 基が結合すると逆にヒスタミン遊離抑制活性が抑制されることも判明した。これまでに、アカキャベツ由来のアントシアニンが比較的強いヒスタミン遊離抑制活性を有することを見いだしてきた。アカキャベツ由来のアントシアニンはそのアグリコンに cyanidin を有し、A 糖に結合したアシル基 (caffeoyl 基または feruloyl 基) に glucose が結合したものやアシル基として sinapyl 基を有するものなど多岐にわたる。その中で活性の発現に sinapyl 基の重要性とともに、A 糖に結合した官能基や糖の存在が逆にその活性を抑制する関係にあるこ

とも明らかにしてきた。アカダイコン由来のアシル化アントシアニンでは、sinapyl 基を有する成分は存在しなかったが、sinapyl 基および、feruloyl 基は methoxyl 基を有し、ヒスタミン遊離抑制活性における methoxyl 基の重要性が考えられる。また、A 糖に結合する官能基によりその活性が抑制されることも共通し、その三次元構造が活性の発現に寄与する可能性が強く示唆された。一方、ionomycin calcium の添加後の細胞内カルシウム濃度の上昇の差は、アントシアニンが蛍光試薬の励起波長に吸収を持つことだけに依存する可能性が強く、RR-A のヒスタミン遊離抑制活性発現に  $Ca^{2+}$  イオンの流入が関与する可能性はアカキャベツ由来のアントシアニンと同様に低いと考えられた。

#### 4.4 遺伝子導入マウスを用いた食品アレルギー免疫応答の解析

卵白食摂取により OVA23-3 マウスに誘導される食品アレルギー反応は、卵白食摂取開始前に TCR アンタゴニスト (A326V) を腹腔内に投与することにより抑制できることが明らかとなった。TCR アンタゴニストは、これまで T 細胞応答の異常が原因となる実験的自己免疫疾患モデルにおいて、発症抑制効果を示すことが明らかにされてきた。我々は、マウスを用いた実験で *in vivo* における抗原特異的抗体 (IgE を含む) は、TCR アンタゴニストペプチドの投与により抑制できることを示してきた。さらに本研究では、より実際の食品アレルギーに近いモデルを構築し、これを用いてアレルギーに対して TCR アンタゴニストが実際に抑制効果を示しうることを、初めて実験的に明らかにすることができた。

この実験モデルで観察される、特異 IgE 抗体産生の上昇、腸管の組織変化、体重減少、下痢などの消化器症状が、どの様なメカニズムで起こっているのか、それぞれの現象が相互にどの様に関係しているのかを明らかにすること、さらに TCR アンタゴニストがこれらの現象を抑制する機構は何かを明らかにすることは今後に残された課題である。また、TCR アンタゴニストを経口的に与えた場合の効果を検討することにより、もしこれが有効であれば、抗アレルギー活性をもつ食品の設計が可能となるかもしれない。

#### 4.5 遺伝子導入マウスを用いた食品中の成分の抗アレルギー活性の検討

同じ OVA23-3 マウスを用いた研究により、ヌクレオチドの経口摂取はマウス脾臓 T 細胞の Th1 型サイトカイン産生を増強することが明らかとなった。また、これはマクロファージ等の IL-12 産生の増強を介して生じていることが示唆された。さらに、ヌクレオチドの経口投与は抗原特異的な IgE 産生を低下させることも明らかとなった。Th1 型の応答はアレルギーに対して抑制的に働くことと考えられており、ヌクレオチドが抗アレルギー効果を示すことが示唆された。

#### 4.6 サトイモ中の抗高脂血作用成分の解明

サトイモ「愛知早生」のエタノール抽出物からラノステロール合成酵素阻害活性を有するいくつかの成分を単離し、その構造を決定した。それらはリノレン酸、リノール酸等のジアシルグリセロールにガラクトース 1 分子もしくは 2 分子結合した monogalactosyldiacylglycerol および、digalactosyldiacylglycerol であった。ラノステロール生合成の前駆体であるオキシドスクワレンと脂肪酸とはある程度構造が類似していることから、脂肪酸部が酵素に認識され、阻害を示した可能性が考えられる。しかし、monogalactosyldiacylglycerol より digalactosyldiacylglycerol の方が活性が強い点を考慮すると、ある程度の親水性も活性発現に必要であるものと考えられる。digalactosyldiacylglycerol は、健康補助食品に利用されている微小緑藻から anti-tumour-promoting 活性物質として単離されており、今後、抗高脂血作用との関連について検討する必要があると思われる。また、これらの微小藻由来の類縁成分について、抗高脂血作用について検討する予定である。

### 5.まとめ

1)ニンジン果汁は、正常動物に対して腸間膜リンパ節のリンパ球組成を変化させることから、消化管免疫系を介して全身の免疫系の制御して可能性が考えられる。2)リンゴポリフェノールの抗アレルギー活性の発現において、重合度のことなる画分の相乗作用が存在し、その要因の一つとして重合度によるタンパク結合性の違いが関与することを証明した。3)アカダイコン由来のアシルアントシアニンについて、ヒスタミン遊離抑制活性を測定し、活性の強いアシルアントシアニンは、feruloyl 基を有することが明らかとなった。また、アカキャベツ由来のアシルアントシアニンとヒスタミン遊離抑制活性も考慮すると、acyl 基中の methoxyl 基が抗アレルギー活性の鍵となっていることが推測された。4)OVA23-3 マウスに OVA を投与し構築した *in vivo* 食品アレルギー反応モデルにおいて、T 細胞応答を抑制する活性をもつ抗原アミノ酸置換アナログ (TCR アンタゴニスト) を投与することにより、食品アレルギー症状を抑制できることを明らかにした。このことは、アレルギーのアミノ酸置換アナログを用いることによる食品アレルギーの抑制が、原理的に実現可能であることを示唆している。5)ヌクレオチドの経口摂取はマウスにおいて Th1 型の免疫応答を高め、抗原特異的な IgE 応答を抑制することを明らかにした。Th1 応答の増強は、ヌクレオチドがマクロ



フェージのような抗原提示細胞による IL-12 産生を高めていることによると考えられた。以上の結果より、ヌクレオチドはアレルギーの抑制に有用であることが示唆された。6) サトイモに含まれる抗高脂血作用を有する成分の単離・同定を行い、活性主成分は digalactosyldiacylglycerol であることを明らかとした。

#### 研究発表

- 1) T. Kojima, H. Akiyama, M. Sasai, S. Taniuchi, T. Kanda, Y. Goda, M. Toyoda, Y. Kobayashi. Antiallergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Allergology International*, **49**, (2000).
- 2) H. Akiyama, J. Sakushima, S. Taniuchi, T. Kanda, T. Kojima, R. Teshima, Y. Kobayashi, Y. Goda, M. Toyoda. Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse. *Biol. Pharm. Bull.* **23** (11) 1370-1373 (2000).
- 3) A. Yanagida, T. Kanda, M. Tanabe, F. Matsudaira, J. G. O. Corderio. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of Mutans Strptococci. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5666-5671 (2000).
- 4) A. Yanagida, T. Kanda, T. Takahashi, A. Kamimura, T. Hamazono, S. Honda, Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*, **890**, 251-259 (2000).
- 5) K. Shida, S. Hachimura, A. Ametani, M. Ishimori, M. Ling, M. Hashiguchi, Y. Ueda, T. Sato, Y. Kumagai, K. Takamizawa, S. Habu, S. Kaminogawa. Serum IgE response to orally ingested antigen: A novel IgE response model using allergen-specific T cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 788-795 (2000).
- 6) S. Nagafuchi, M. Totsuka, S. Hachimura, M. Goto, T. Takahashi, T. Yajima, T. Kuwata S. Kaminogawa. Dietary nucleotides increase the proportion of a TCR $\gamma\delta^+$  subset of intraepithelial lymphocytes (IEL) and IL-7 production by intestinal epithelial cells (IEC); implications for modification of cellular and molecular cross-talk between IEL and IEC by dietary nucleotides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1459-1465 (2000).
- 7) S. Nagafuchi, S. Hachimura, M. Totsuka, T. Takahashi, M. Goto, T. Yajima, T. Kuwata, S. Habu, S. Kaminogawa, Dietary nucleotides can up-regulate antigen-specific Th1 immune responses and suppress antigen-specific IgE responses in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **122**, 33-41 (2000).
- 8) M. Hashiguchi, S. Hachimura, A. Ametani, S. Kaminogawa, Th2 polarization enhanced by oral administration of higher doses of antigen. *Cytotechnology* **33**, 237-245 (2000).
- 9) T. Shoji, Y. Goda, M. Toyoda, A. Yanagida, T. Kanda. Characterization and structures of novel anthocyanin pigments in rose cider during vinification process. *Phytochemistry* accepted.
- 10) J. Sakushima, H. Akiyama, T. Shoji, T. Kanda, A. Yanagida, K. Nakagawa, Y. Goda, M. Toyoda. Effect of apple polyphenols and its oligometric fraction on the histamine release from RBL-2H3 cells and allergic model mice. in preparation.
- 11) M. Mutsuga, Y. Sakano, H. Suganuma, T. Inakuma, Y. Goda, M. Shibuya, Y. Ebizuka, M. Toyoda. Inhibitors of human lanosterol synthase in *Colocasia esculenta*. in preparation.

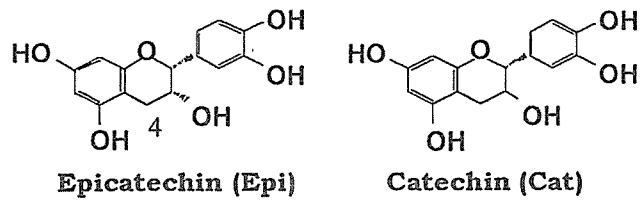


Fig. 1 Units of procyanidin oligomer

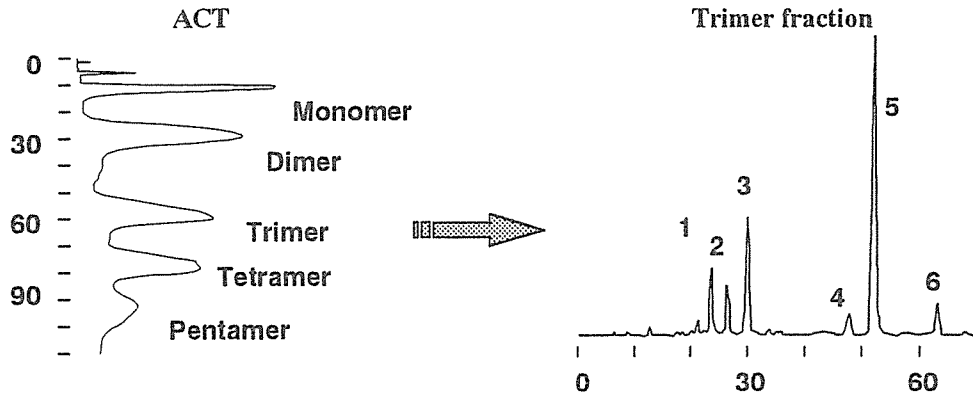


Fig. 2 Chromatograph of ACT and trimer fraction

Table I Structure of trimers in ACT

	C unit		B unit		A unit
Peak 1	Epi	4 $\beta$ → 8	Epi	4 $\beta$ → 8	Cat
Peak 2	Epi	4 $\beta$ → 8	Epi	4 $\beta$ → 6	Cat
Peak 3	Epi	4 $\beta$ → 8	Epi	4 $\beta$ → 6	Epi
Peak 4	Epi	4 $\beta$ → 6	Epi	4 $\beta$ → 8	Cat
Peak 5	Epi	4 $\beta$ → 8	Epi	4 $\beta$ → 8	Epi
Peak 6	Epi	4 $\beta$ → 6	Epi	4 $\beta$ → 8	Epi

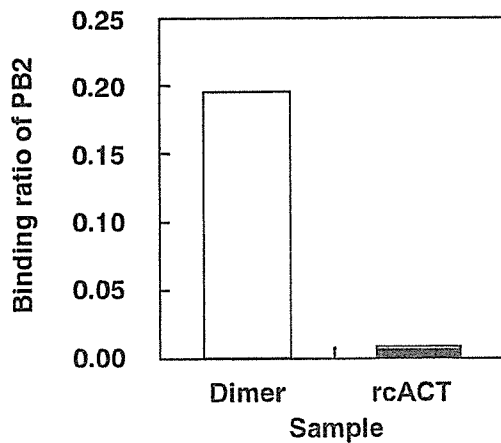


Fig. 3 Binding ratio to protein of PB2 in dimer fraction or ACT

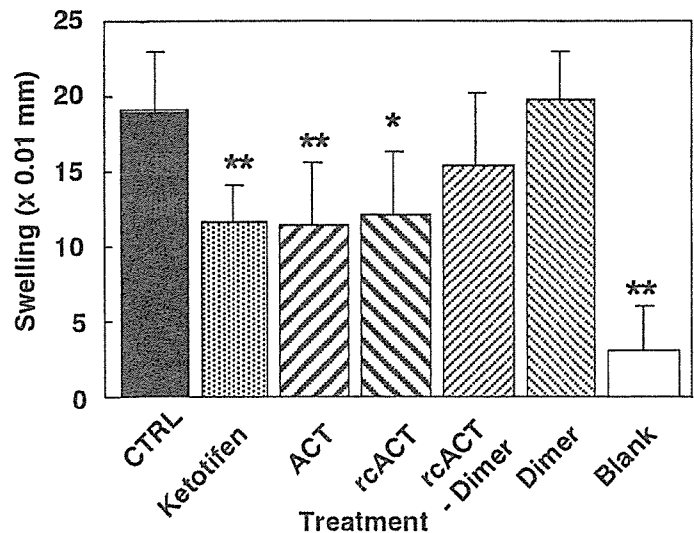


Fig. 4 Synergistic effect of dimer and the other fraction from ACT on the ear swelling response of the type I allergic model mice

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of 6 mice.  
 \*\*p<0.01, \*p<0.05 vs. the control group.

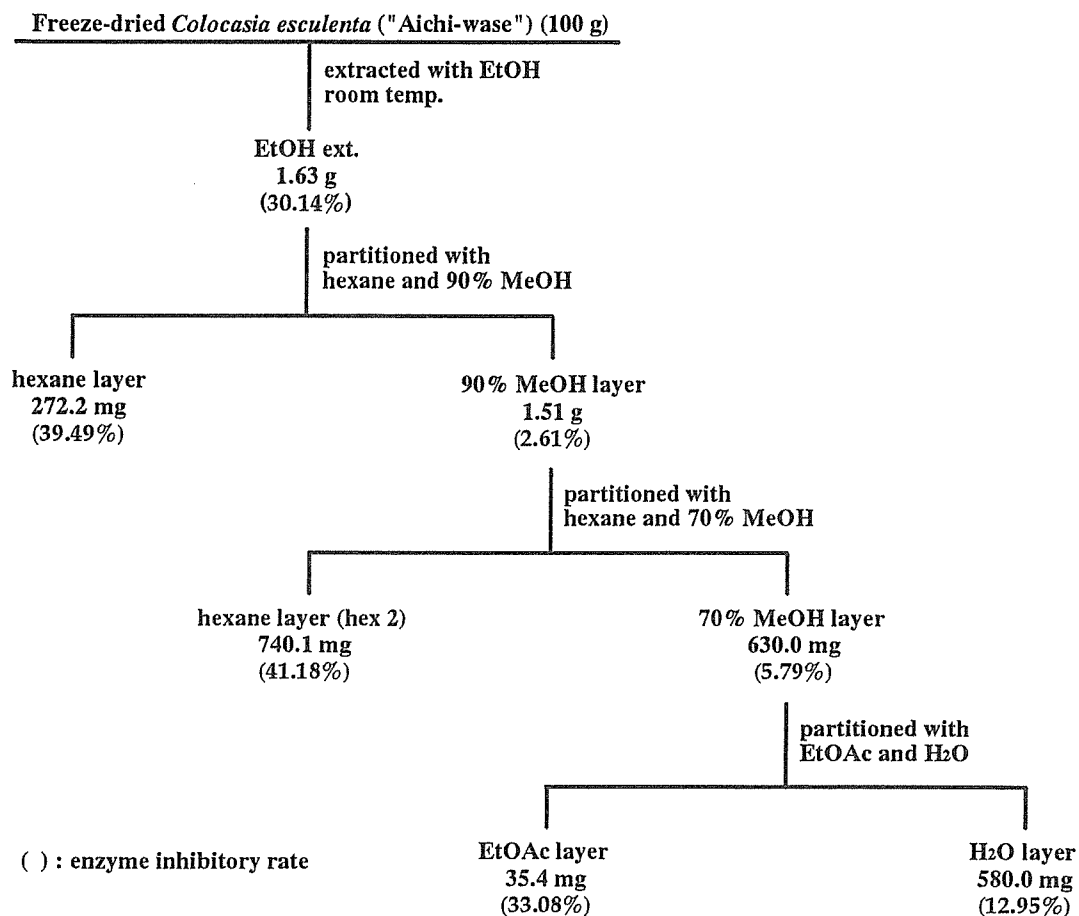


Fig. 5 Fractionation of *Colocasia esculenta* ("Aichi-wase") and inhibitory activities of obtained fractions

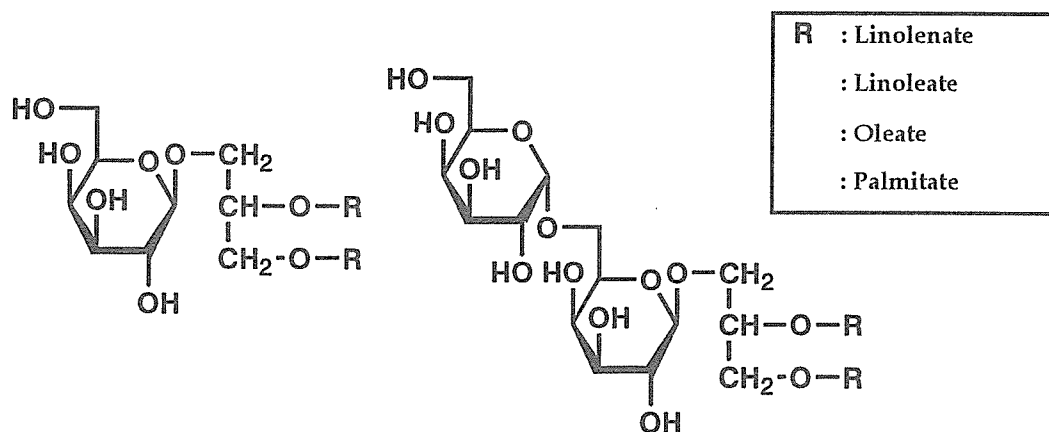


Fig. 6 Isolated compounds as main active components from hex 2 fraction

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社