

平成13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

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所・生薬部
研究者 合田幸広

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 合田幸広、食品部 穂山 浩
- (2) アサヒビール(株) 酒類研究所 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) 第一研究部 大本俊郎
- (5) 東京大学大学院農学生命科学研究科 上野川 修一
- (6) 東京大学大学院薬学系研究科 海老塚 豊

要旨

食品として、ひとの健康保持増進や疾病予防に積極的に役立つ食品化学的特性を持つ新機能素材を評価系を開発し、素材中の活性成分並びに活性機構の解析を行った。食品化学的特性としては、抗アレルギー性、抗高脂血性、抗炎症性、抗日和見感染症作用等を対象とした。

1. 研究目的

食品として、ひとの健康保持増進や疾病予防に積極的に役立つ食品化学的特性を持つ新機能素材を評価する。食品化学的特性としては、抗アレルギー性と、抗高脂血性、抗炎症性、抗日和見感染症作用等を対象とし、有用な活性をもつ素材について、活性成分並びに活性機構の解析を行う。種々の食品には、アレルギー反応を起こすアレルゲンや、高脂血症を起こす成分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したり、抗脂血作用を持つ食品があることも明らかになっている。従って、食品及び食品素材について抗アレルギー活性並びに抗脂血活性を評価し、さらにその活性成分及び作用を解明、解析することで、これらの有用な活性を持つ新機能素材の開発につながるだけでなく、食品のもつダイナミックな体調節作用を科学的根拠に基づき説明することが可能になる。抵抗力が低下した高齢者に多発する日和見感染は、真菌による感染である。予防として抗真菌薬の投与は危険であり、QOL を考えると抗真菌成分を含む食品の摂取が効果的である。本研究では、抗真菌作用の評価系の開発も行い、真菌に選択的に作用する食品並びに食品素材を検索する。

2. 研究方法

2.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

60種の野菜のエタノール抽出物について、既に確立したヒト由来ラノステロール合成酵素及び、 $[^{14}\text{C}]$ 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。27品種のサトイモのエタノ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。60種の野菜のエタノール抽出物について既に確立したヒト由来ラノステロール合成酵素及び、 $[^{14}\text{C}]$ 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行った。

さらに45種類の食品素材について、各5gを100 mLの95%エタノール、50%エタノールおよび水によ

り 80 °C、2 時間で抽出を行なった。得られた 64 種のエキスを濃縮・乾燥した後、同インビトロアッセイ法によりスクリーニングを行なった。次に、活性の見られたセイヨウノコギリソウ (*Achillea millefolium* L.) の花蕾 1kg について、エタノール抽出を行った後、メタノール・ヘキサンで分配し、メタノール抽出物 30 g、ヘキサン抽出物 13.5 g を得た。

2.2 抗日和見感染症作用の評価系の開発に関する研究

既にクローニング(R. Kelly, et. al., Gene, 87, 177-183 (1990))されているカンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子をガラクトースで誘導されるプロモーターを持つ酵母発現ベクター(pYES2)に組み込み、ラノステロール合成酵素欠損の酵母株 GIL77 を形質転換する。ガラクトースで誘導後、細胞を収穫し無細胞系酵素画分を調製する。 [¹⁴C] 標識オキドスクアレンとインキュベートし酵素活性を測定することにより、in vitro のカンジダ菌のラノステロール合成酵素に対する阻害活性評価系の構築を行った。

2.3 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

昨年度までの研究でリンゴ未熟果実中プロアントシアニジンである縮合型タンニン画分 (ACT) が、in vitro 及び in vivo で 型アレルギーに対して抗アレルギー活性を有することを報告してきた。本年度は、まずウイスター系ラットを用いて ACT の吸収動態について検討を行った。ACT は、リンゴポリフェノールよりスチレン系吸着樹脂カラム、逆相系カラムを用いて分画した。次いで 8 週令ウイスター系ラットに経口投与し、経時的に全量採血し血漿中のプロシアニジン含量を比色定量した。

次に、ACT の中で最も in vivo 活性が強い 2 量体の主成分である procyanidin B2 (PB2) をについて、マウスへの経口投与後の吸収率、及び血中動態を追跡した。雌性 BALB / c マウス 7 週齢に PB2 一定量 (400µg / mouse) を単回経口投与後、一定時間 (0 分、15 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間) 経過後の血液を段階ごとに採取し、血清試料を得た。血清試料は、96-Well SPE Plate (3M Empore ユニバーサルプレート) を用いて、除タンパク・クリーンアップ処理を行ない、この抽出試料について、LC/ECD により PB2 の測定を行なった。分離カラムには Inertsil Ph-3 (3mm) 3.0×150mm を用いた。

2.4 体外免疫法を用いた抗アレルギー活性評価法の開発

雌性 BALB/c マウス(7 週齢)にチオグリコレート培地を腹腔投与した。4 日後、脱血致死させたマウス腹腔内に抗生物質含有 PBS を注入し腹腔細胞を遊離させて回収し、無血清培地に浮遊させた。予め調製しておいた血清吸着シャーレに細胞浮遊液を注ぎ 37°C、5%CO₂ 下 15 分放置した。シャーレ底面を培養液で洗浄してリンパ球を除去した後にマクロファージを採取した。採取したマクロファージを細胞培養液に浮遊させ培養プレートに分注し、更に抗原を添加(30 ng/mL)して 37°C、5%CO₂ 下 24 時間感作させた。感作後マクロファージ付着シャーレの上清を捨て、新たに調製したマウス(雌性 BALB/c、10 週齢)脾細胞浮遊液に C57BL/6 マウス及び BALB/c マウス胸腺細胞培養(3 日間)上清を各 5%添加した浮遊液を分注し、抗原を 30 ng/mL となるように添加し 5%CO₂ 下 37°C、72 時間混合培養した。培養後、培地中に産生されたサイトカイン及び抗体を ELISA 法で定量した。

2.5 コンドロイチン硫酸の OVA 感作マウス脾細胞に及ぼす影響

雌性 BALB/c マウス 7 週齢に卵白アルブミン (OVA) を腹腔感作し、2 週間後に同量 2 次免疫した。2 次免疫後、脾臓を摘出して細胞懸濁液(1.0 x 10⁷ cells/mL)を調製し、培養プレートに分注した。in vitro において OVA 再刺激した後、平均分子量 15,000 のコンドロイチン硫酸を最終濃度 1 ppm 及び 0.1 ppm となるように添加した。比較化合物には同等の分子量を有するデキストランを用いた。コントロールには生理食塩水を添加した。培養温度 37°C、CO₂ 濃度 5%の条件で培養し、3 日、7 日、14 日後に培養液を回収し各種サイトカイン産生量及び OVA 特異的 IgE 抗体価を ELISA 法により定量した。

2.6 食品アレルギー動物モデルにおける腸管免疫応答の解析

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。このマウスは東海大学医学部垣生園子教授らによって作製されたものである。OVA23-3 マウスに、20%卵白タンパク質を含む飼料 (卵白食) を自由摂取させることにより、血清中の OVA 特異 IgE 抗体価の上昇、小腸に食品アレルギー患者に認め

られるものと同様の組織学的変化が生じることを、これまでの研究で明らかにしている。この系は *in vivo* における食品アレルギー反応モデルとして有効であると考えている。本研究ではまず、OVA23-3 マウスに卵白食を摂取させる条件を再検討した。すなわち、6 週間自由摂取させた後、卵白タンパク質を含まない飼料 (CE-2 食) を 4 週間摂取させ、再度卵白食を自由摂取させることを試みた。次に、このモデルにおける食品アレルギー反応を抗原のアミノ酸置換アナログを用いて抑制する方法を検討した。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) の一アミノ酸残基置換アナログのうち、³²⁶Ala 残基を Val 残基に置換したペプチド A326V は 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) を示すことを既に明らかにしている。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、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。

さらに、分子生物学的な手法を用いて、食品アレルゲンに対する腸管免疫応答における IEL の役割を明らかにするために、ディファレンシャルディスプレイ (Differential Display; DD) 法を用いて IEL あるいは脾臓 T 細胞に特異的に発現する遺伝子の断片を取得した。DD 法とは、異なる細胞由来の RNA から合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、その産物の電気泳動像において両者間で違いの見られるバンドを切り出し、解析することによって、細胞間において発現差のある遺伝子を同定する手法である。ここでは、OVA23-3 マウスと同様に OVA323-339 を認識する TCR 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (DO11.10 マウス) を用い、OVA 特異的 TCR を発現する、CD4⁺IEL (CD4⁺CD8⁻IEL と CD4⁺CD8⁺IEL を含む) と脾臓 CD4⁺ T 細胞をフローサイトメトリーによるセルソーターを用いて分離し、DD 法を行った。IEL には、脾臓 T 細胞中にはごくわずかしかな存在しない γ 鎖、 δ 鎖からなる TCR を発現する細胞 (通常の脾臓 T 細胞は α 鎖と β 鎖からなる TCR) や、 α 鎖のホモ二量体からなる CD8 分子 (通常の脾臓 T 細胞は α 鎖 β 鎖のヘテロ二量体 CD8 分子) が多く存在する。これらの分子と CD4 分子の発現の組合せにより、IEL は 5 種のサブセット (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻, TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺)、脾臓 T 細胞は 2 種のサブセット (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺) に分けられる。上記で得られた候補遺伝子断片に対して、各細胞由来の RNA から合成した cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、各細胞間での発現差を確認した。各細胞は BALB/cA マウスよりフローサイトメトリーによるセルソーターを用いて分離した。

3. 研究成果

3.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

強いヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性を示したサトイモについて同酵素阻害活性を指標として、詳細な検討を行った。その結果、27 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分画し、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 及び 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 monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) 及び、digalactosyl diacylglycerol (DGDG) 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。サトイモ画分 D から単離した MGDG は 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 28-36%、画分 G から

単離した DGDG は 41-67% のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性を示した。

次に、45 種の食品素材から得られた 64 種のエキスについて、ラノステロール合成酵素阻害活性を調べた。その結果 95% エタノール抽出分についてはセイヨウノコギリソウ (*Achillea millefolium* L.) の花部 (42% inhibition)、ローレル (*Laurus nobilis* L.) 粉末 (55% inhibition)、ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* MARC.) のパルプ部 (50% inhibition) に同酵素阻害活性がみられた。その他キサミカンゾウ、コリアンダーゲンケイ、ニクジュヨウ、バイセンチコリ、リュウガンニク、レイシ、レモングラス、レモンバーム等は 10% 以下の阻害活性であった。また 50% エタノール抽出分ではアセンヤク (阿仙薬、*Uncaria gambir* の葉および若枝) 末 (49% inhibition)、グリーンペッパー粉末 (67% inhibition)、ローレル粉末 (21% inhibition) に阻害活性があることがわかった。アニスシード、エソウコギ、カキノハ、カラフトイラクサ、カルダモンコース、キサミカンゾウ、キダチアロエ、クコシ、クローブゲンケイ、クロコショウ、ゲンチアナマツ、ジャスミン、スターアニスパウダー、スパイスミックス、スペアミント、セージ、ターメリック、ナツメグコース、バイセンチコリ、パセリチップ、ハナサンショウパウダー、フェネルシード、ホワイトペッパー、マジョラム、マスタードシード、メースパウダー、モミノリパウダー、ラカンカ、レイシ、レモングラス、レモンバーム等は 10% 以下の阻害活性であった。水抽出分については、キサミカンゾウ、コリアンダーゲンケイ、セイヨウノコギリソウ、ナツメ、バイセンチコリ、リュウガンニク、レイシ、レモングラス、レモンバーム、ローレル、抗菊花等、すべてその阻害活性が 10% 以下であった。

次に、強い活性が見られたセイヨウノコギリソウ (*Achillea millefolium* L.) の花蕾 1kg について、エタノール抽出を行った後、溶媒分画を行い、各画分につき、HPLC/PDA 分析を行った。その結果、主成分として、フラボノイド配糖体が含まれている可能性が高いことが判明した。

3.2 抗日和見感染症作用の評価系の開発に関する研究

カンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子が組み込まれたプラスミドを入手した。このプラスミドを鋳型に PCR を行い、カンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子を増幅し、市販されている酵母の発現ベクター pYES2 に組み込んだ。構築したプラスミドでラノステロール合成酵素欠損の酵母株 (GIL77) を形質転換した。形質転換酵母において栄養要求性の相補がおこり、形質転換酵母はエルゴステロールが欠如した培地で成育可能となった。この形質転換酵母を培養し各プロモーターを誘導後、細胞を収穫破碎し、無細胞抽出液を調製した。この無細胞抽出液と [¹⁴C] 標識オキシドスクアレンを用いてラノステロール合成酵素活性を調べたが、酵素活性は検出限界以下であった。

3.3 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

リンゴポリフェノールから得られた ACT 画分を投与後、経時的に採血測定した結果、投与後 2 時間を最大として ACT 含量が増加し、その後減少していた。また投与 2 4 時間後でも、血液中に残存していることが確認された。さらに、血中への移行は、用量依存的に増加することが確認された。

LC/ECD を用いた PB2 の検量線は 100ng/mL~1 μ g/mL の範囲で ($r=0.9998$ 以上) 良好な直線性を示した。本検量線を使用して測定したマウス血清中の PB2 の検出限界は、30ng/mL であった。また、添加回収実験では 85% 以上という良好な回収率が得られた。今回確立した方法を用いて実験を行ったところ、経口投与後の PB2 レベルは、30 分後に血中濃度が最大となり、その後は徐々に減少していくことが確認された。

3.4 体外免疫法を用いた抗アレルギー活性評価法の開発

マウスアルブミン、オボアルブミン、 β -ラクトグロブリンの異なる 3 種の抗原を用いて抗アレルギー活性評価を検討した。その結果、刺激した腹腔マクロファージ量に個体差があり、通常マウス 1 匹より 1~2 x 10⁷ 個のマクロファージが回収されるところ、その回収率が 50~60% と悪いことが判明した。また、クラススイッチ誘導のため、分化誘導因子として TGF- β 及び IL-5 を添加したところ、72 時間の培養期間中に脾細胞数が著しく減少すること、培地中に産生される抗体量及びサイトカインの量が同一条件において均一でなく、その再現性が無いことなど、いくつかの問題点が明らかとなった。

3.5 コンドロイチン硫酸の OVA 感作マウス脾細胞に及ぼす影響

培養液中各種サイトカインを ELISA 法で定量したところ、コンドロイチン硫酸添加群はコントロール群と比較して、IFN- γ 及び IL-2 は有意に増加し、IL-5 及び IL-10 は有意に減少することが明らかとなった。また、デキストランとの比較においても、コンドロイチン硫酸の方が強い活性を示す傾向が認められた。OVA 特異的 IgE はコンドロイチン硫酸を添加することにより、その産生が有意に抑制された。

3.6 食品アレルギー動物モデルにおける腸管免疫応答の解析

卵白食摂取（摂取量は 1 匹あたり一日 OVA として約 200 mg）を 6 週間続けた後、4 週間 CE-2 食を摂取させ、再度卵白食を摂取させたところ、卵白食摂取の再開後 1~2 週間で、血中の OVA 特異的 IgE 産生応答が著しく増加した。そこで卵白食を再摂取させた時に誘導される特異 IgE 産生応答を、TCR アンタゴニスト活性をもつ A326V を投与することにより抑制できるかどうかを検討した。この実験系では、卵白食の摂取開始前および再摂取前の 2 つの時期に、A326V の投与を行なった群（A326V \times 2）と卵白食摂取開始前にのみ投与を行なった群（A326V \times 1）を TCR アンタゴニスト投与群として設けた。その対照群として、PBS \times 1 群および PBS \times 2 群、また卵白食摂取のみの群を設けた。血清中 OVA 特異的 IgE 抗体の濃度を測定したところ、卵白食再摂取後に、卵白食摂取のみの群、PBS \times 1 および PBS \times 2 群では非常に強い IgE 抗体産生応答を示す個体が認められた。他方、A326V \times 2 群ではこのように非常に強い IgE 抗体産生応答を示す個体がなく、また A326V \times 1 群においてもこのような個体は認められなかった。これより A326V の投与により卵白食の再摂取により誘導される、強い OVA 特異的 IgE 抗体応答が抑制されることが明らかとなった。次に IgE 抗体と同様に Th2 型の応答で誘導される IgG1 抗体応答について検討したところ、卵白食再摂取前、再摂取後のいずれにおいても群間で OVA 特異的 IgG1 応答に差は認められなかった。したがって A326V 投与による OVA 特異的抗体応答の抑制効果は IgE 抗体応答に限定されるものである可能性が示唆された。各群のマウスの体重を測定したところ、全てのコントロール群において、卵白食の摂取開始 1 週間後に体重の減少が認められた。これに対し A326V \times 1 群及び A326V \times 2 群のいずれにおいても、卵白食摂取を開始した後に体重の減少は観察されなかった。卵白食の再摂取 1 週間後には、PBS \times 1 群において体重の減少が認められた。PBS \times 2 群、飼料摂取のみの群では緩やかな体重増加が認められた。これに対し A326V \times 1 群及び A326V \times 2 群のいずれにおいても、体重は増加していた。特に A326V \times 2 群で顕著であった。上記の結果より、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。

次に分子生物学的な手法を用いて、食品アレルゲンに対する腸管免疫応答における IEL の役割を明らかにするために、IEL あるいは脾臓 T 細胞に特異的に発現する遺伝子の解析を行った。まず、DD 法により CD4⁺IEL と脾臓 CD4⁺T 細胞の間での遺伝子発現の比較解析を行った。その結果、CD4⁺IEL に強く発現している遺伝子の候補として 217 個、脾臓 CD4⁺T 細胞に強く発現している遺伝子の候補として 53 個、合計 270 個の DNA フラグメントを得ることができた。IEL には大別して 5 種類のサブセットが存在しているが、これらのサブセットにおいて、ここで得た候補遺伝子がどのように発現しているかを解析することにより、各遺伝子が IEL 全般に強く発現しているのか、または特定のサブセットにのみ発現しているのか等が判別でき、各 IEL サブセットの性質をより深く理解できるものと考えられる。そこで、上記の候補遺伝子が、IEL の 5 種類のサブセット、および脾臓 T 細胞の 2 つのサブセットにおいてどのような発現パターンを示すかについて、各サブセットの細胞から抽出した RNA を鋳型として合成した cDNA をプローブとしてディファレンシャルハイブリダイゼーション法により解析を行った。その結果、DD 法によって得られた 270 個の候補遺伝子のうち、脾臓 CD4⁺T 細胞と比較して、CD4⁺IEL に特に強く発現していることが確認できたものは 30 個であった。さらにそのうち、脾臓 CD4⁺T 細胞と比較して CD4⁺IEL での発現が高い上位 20 個の DNA 断片について塩基配列を決定した。その後、その塩基配列を核酸データベース上で相同検索を行い、各クローンの遺伝子を同定した。その結果、20 個の DNA 断片のうち、8 個が細胞傷害活性を担う分子の一つであるグランザイム A 遺伝子に由来する DNA 断片であることが判明した。また、グランザイム A の CD4⁺ CD8⁺ IEL での発現（脾臓 CD4⁺T 細胞の約 2 倍）は、他の 4 つ

の IEL サブセットでの発現（脾臓 CD4⁺T 細胞の約 100 倍以上）と比べて著しく低いものであった。これ以外に同定された DNA 断片は、F-actin capping protein、calmodulin、および ADP-ribosyl transferase と、既知の EST クローンとの相同性が認められたものが 5 つ、相同性が認められなかったものが 4 つであった。

4. 考察

4.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

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 MGDG および、DGDG であった。ラノステロール生合成の前駆体であるオキ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。これらの MGDG、DGDG はそのグリセロール部の脂肪酸の組成が異なるものが多数天然より見つかっており、その脂肪酸の違いにより同酵素阻害活性の強さも異なることが予想される。そこでサトイモより見つかった MGDG、DGDG とは脂肪酸の組成が異なる類縁体を合成し、その活性について比較することにした。まず、DGDG よりはその合成が容易であると考えられる MGDG 類の合成に着手した。合成法についてはグリセロール部の任意の位置に、任意の脂肪酸を導入でき、さらに不安定な不飽和脂肪酸も導入できる方法を検討した。その結果、D-galactose を開始物質とし糖部の水酸基の保護基に MPM 基を用い、グリセロール部の二つの水酸基を別々の保護基で区別した後、1 級水酸基である sn-1 位から順にアシル化を行なうという方法で位置選択的に脂肪酸を導入することにした。今後、種々の MGDG を合成し、構造活性相関について検討を行なう予定である。

45 種の食品素材についてラノステロール合成酵素阻害活性を指標として一次スクリーニングを行なったところ、数種の素材について比較的強い活性が見られた。今後、セイヨウノコギリソウ (*Achillea millefolium* L.) について、さらに分画をすすめ、活性成分の解明をはかるとともに、ローレル (*Laurus nobilis* L.) 粉末についても、同様の検討を行う予定である。

4.2 抗日和見感染症作用の評価系の開発に関する研究

ラノステロール合成酵素欠損の酵母株に対して、栄養要求性の相補が生じたことより、カンジダ菌のラノステロール合成酵素遺伝子が発現していることは明白である。In vitro の酵素活性が検出限界以下であったのは、プロモーターの誘導法、無細胞抽出液の調製法等になんらかの問題があったか、あるいは、カンジダ菌のラノステロール合成酵素の酵母での安定性に何らかの問題があるものと推定された。

4.3 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

リンゴポリフェノールの主要活性成分と考えられている ACT はラットに経口投与後血中に移行することが確認され、吸収後、抗アレルギー活性の発現に関与していると考えられた。また、マウスに経口投与した PB2 は LC/ECD での血清からの検出が可能であった。経口投与後の PB2 の未代謝体の血中濃度レベルは低く、投与 30 分後に最大値を示すことが判明した。また、血中に移行した PB2 量は、投与量の 3% 程度であった。従って、経口投与後の PB2 は、大部分が吸収されないか、または吸収後速やかに代謝される可能性が示唆された。これまでの研究から、ACT の抗アレルギー活性は、PB2 等の低分子と、高分子画分との相乗作用により、発現することが判明している。今回の実験結果から、epicatechin の dimer である PB2 の血中移行率は、かなり低いことが明らかとなった。In vivo における抗アレルギー活性発現において、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。PB2 の単独投与の場合、PB2 の血中移行率がかなり低いことを考慮すれば、ACT として投与された場合では、消化管内での相乗作用により、PB2 の単独投与の場合より吸収の効率が促進されている可能性も考えられる。また、分子量を考慮すれば、Epicatechin 等のモノマーの移行率は PB2 より高いものと考えられる。従って、monomer 類の活性への関与も考慮する必要がある。今後、ACT 投与時の血液中の各プロシアニジン類の挙動を個別に解析する計画である。

4.4 体外免疫法を用いた抗アレルギー活性評価法の開発

体外免疫法は、(1)免疫感作の間、抗原濃度を保持できる。(2)免疫寛容のために従来の免疫感作法で産生されない自己抗原に対する抗体が生産可能。(3)微量抗原(30 ng/mL)で実施可能。(4)生体内毒性抗原を免疫感作できる。(5)従来の免疫感作法と比較し操作時間が短い。(6)従来の免疫感作法と比較して IgA の収量が多い。(7)低分子ペプチド抗原を免疫感作できる。(8)免疫感作の実験動物数を節約できるなど、数多くの利点が挙げられ利用価値の高い手法である。本年度は同法を確立するには至らず、いくつかの問題点が挙げられたが、それらの問題点の改善を詳細に検討する必要がある。今後、抗アレルギー活性評価に適した体外免疫法の確立をめざし、同手法を用いた活性評価法の開発につなげることが急務であると考えられた。

4.5 コンドロイチン硫酸の OVA 感作マウス脾細胞に及ぼす影響

免疫調節に重要なヘルパー T 細胞には、Th1 と Th2 の 2 種類が存在し、それらの細胞が産生するサイトカインのバランスによって細胞性免疫と体液性免疫が制御されることが知られている。本研究の結果、免疫感作マウス脾細胞にコンドロイチン硫酸を添加することによって Th1 細胞産生サイトカイン(IFN- γ 及び IL-2)が有意に増加し、Th2 細胞産生サイトカイン(IL-5、IL-10)が有意に減少し、Th1/Th2 バランスを Th1 に誘導することが示唆された。また、OVA 特異的 IgE 産生がコンドロイチン硫酸添加によって有意に抑制された結果からも、Th1 型サイトカインの IFN- γ や IL-2 が Th2 細胞に対して抑制的に作用することが示唆された。中性多糖であるデキストランとの比較において、コンドロイチン硫酸の方が高い活性を示す傾向が認められた結果から、Th1 への誘導は多糖類全般の非特異的な効果ではなく、酸性多糖類に特異的な活性であると考えられた。また、コンドロイチン硫酸添加によって IgE 産生を抑制した結果から、同化合物が抗アレルギー活性を有する可能性が示唆された。

4.6 食品アレルギー動物モデルにおける腸管免疫応答の解析

OVA23-3 マウスに卵白食を長期間投与させた後、4 週間の中断期間をはさんで再び卵白食を摂取させることにより、OVA 特異的 IgE 抗体の産生が著しく高まることが明らかとなった。これはアレルゲンに既に感作されているアレルギー患者が再び同じアレルゲンに暴露された時の応答に対応する実験系であると考えられる。また、卵白食再摂取後の IgE 抗体応答に対して、最初の卵白食摂取開始前にだけ TCR アンタゴニスト (A326V) を腹腔内に投与することでも、抑制効果があることが明らかとなった。今回の実験では、卵白食の再摂取前にのみ TCR アンタゴニストを投与した場合は検討していないが、もしこの場合にも抑制効果が認められれば、既に食品アレルギーに感作されている患者の発症予防法として有効な方法になる可能性がある。TCR アンタゴニストを経口的に与えた場合にも抑制効果を示すかどうかについて検討することは、抗アレルギー食品の開発という面からも重要であろう。

CD4⁺IEL と脾臓 CD4⁺T細胞由来に発現する mRNA の違いを DD 法により解析した結果、IEL と脾臓 T 細胞間において遺伝子発現パターンに差があることが示された。さらに IEL の中でも、各サブセット間で遺伝子発現パターンに差があることが示された。このことより、同じ IEL の中でもサブセットによって性質や機能が異なるということが遺伝子発現の面から明らかになった。これまでグランザイム A はほとんどの IEL が保持していると言われていたが、CD4⁺CD8⁻IEL 以外のサブセットはグランザイム A を強く発現しているが、CD4⁺CD8⁺IEL での発現は著しく弱いことが本研究で初めて明らかにされた。IEL は傷害顆粒を保持するなど強い細胞傷害活性をもち、腸管での感染防御に機能していると考えられているが、CD4⁺CD8⁺IEL はそういった機能を有していないこと、腸管で感染防御ではなく食品抗原などに対する応答に関与していることが強く示唆された。今後、IEL に特徴的な遺伝子の機能について解析することにより、IEL の生理機能を明らかにすることができるものと考えられ、腸管の免疫機構の解明やそれに関連した食品アレルギー等の疾患の治療に寄与ものと考えられる。

5. まとめ

1) 抗高脂血症作用を有する新機能素材としてサトイモを取り上げ、同野菜より抗高脂血症作用を有する成分の単離・同定を行い、活性主成分は monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) 及び, digalactosyl

diacylglycerol (DGDG)であることを明らかにした。さらに、45種類の食品素材について、ヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性を検討した結果、セイヨウノコギリソウの花部、ローレル (*Laurus nobilis* L.) 粉末、ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* MARC.) のパルプ部等に活性が見られることを明らかにした。2) 抗日和見感染症作用の評価系を構築するために、カンジダ菌のラノステロール合成酵素を標的として選択した。In vitro の酵素活性測定をするために、既にクローニングされているカンジダ菌のラノステロール合成酵素をラノステロール合成酵素欠損の酵母株で発現させた。栄養要求性の相補は確認できたが、in vitro の酵素活性を検出できなかった。導入した遺伝子が発現していることは明白であり、来年度は、プロモーターの誘導法、無細胞抽出液の調製法、等について検討を加え、in vitro の酵素活性測定による抗日和見感染症作用の評価系を構築する予定である。3) 動物に経口投与されたリンゴポリフェノール類の血中移行について検討した。その結果、血液中に PB2 が確認され、リンゴポリフェノールが吸収され、抗アレルギー活性を示している可能性が示唆された。4) 体外免疫法を用い抗アレルギー活性評価への応用を試みたところ、数種の問題点が挙げられ同法を確立するに至らなかった。しかしながら同法は多くの利点を有するため、今後抗アレルギー活性評価に適した体外免疫法の構築を目指す。5) コンドロイチン硫酸は、Th1/Th2 バランスを Th1 に誘導することで全身性免疫系に影響を与えることが初めて示された。6) アレルゲンに既に感作されているアレルギー患者が再び同じアレルゲンに暴露された時の応答に対応すると考えられる実験系を構築することができた。また、卵白食開始前にだけ TCR アンタゴニストを投与することによって、この系における食品アレルギー応答を抑制することができた。さらに、IEL と脾臓 T 細胞の違いを遺伝子発現のレベルから明らかにすることができた。また、IEL のサブセット間でも遺伝子発現が異なることが判明した。

研究発表

1. H. Akiyama, R. Teshima, J.-i. Sakushima, H. Okunuki, Y. Goda, J.-i. Sawada, M. Toyoda, "Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice," *Immunology Letters*, 78, 1-5 (2001).
2. S. Takagi, K. Nakagomi, Y. Sadakane, T. Tanimura, H. Akiyama, S. Oka, Y. Fukumori, K. Terasawa, Y. Hatanaka, "Anti-allergic activity of glycopeptide isolated from *Perilla frutescens* Britton," *J. Trad. Med.* 18, 239-244 (2001).
3. Y. Kato, H. Sato, H. Aoki, Y. Goda, "Chemical structure of an anthocyanin pigment isolated from "Myoga" (*Zingiber mioga* Rosc.)," *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 197, 28-33 (2002).
4. T. Shoji, Y. Goda, A. Yanagida, T. Kanda, "Characterization and structures of novel anthocyanin pigments in rose cider during vinification process," *Phytochemistry*, 59, 183-189 (2002).
5. Y. Ueda, S. Hachimura, T. Somaya, T. Hisatsune, S. Kaminogawa, "Apoptosis of antigen-specific T cells induced by oral administration of antigen: comparison of intestinal and non-intestinal immune organs." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1170-1174 (2001).
6. K. Asai, S. Hachimura, T. Toraya, S. Kaminogawa, "Orally tolerant CD4 T cells respond poorly to antigenic stimulation but strongly to direct stimulation of intracellular signaling pathways." *Cytotechnology* 36, 145-153 (2001).
7. W. Ise, M. Totsuka, Y. Sogawa, A. Ametani, S. Hachimura, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, S. Kaminogawa, "Naive CD4⁺ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell-surface molecules on their primary response to varying doses of antigen." *J. Immunol.*, in press (2002).
8. T. Yoshida, S. Hachimura, M. Ishimori, F. Kinugasa, W. Ise, M. Totsuka, A. Ametani, S. Kaminogawa, "Antigen presentation by Peyer's patch cells can induce both Th1 and Th2 type responses depending on antigen dosage, but a different cytokine response pattern from that of spleen cells." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2002).
9. T. Ohtsuki, H. Matsufuji, M. Toyoda, Y. Goda, "Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.)," *Phytochemistry*, in press (2002).
10. T. Shoji, A. Yanagida, Y. Goda, H. Akiyama, T. Kanda, "Analysis of polymeric anthocyanins in rosé cider and model cider using LC/ESI-MS and MALDI-TOF/MS." *J. Agric. Food Chem.* submitted.

平成13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

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10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