

平成15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

# 目 次

## 第3分野

### 課題番号

|                      |  |             |
|----------------------|--|-------------|
| 20030917A<br>KH31028 | 非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価                   | 吉岡澄江 …… 1   |
| 918A<br>KH31029      | ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発                                    | 能美健彦 …… 10  |
| 919A<br>KH31030      | バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発                                | 川崎ナナ …… 18  |
| 920A<br>KH31031      | 医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究          | 棚元憲一 …… 27  |
| 921A<br>KH31032      | 動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究         | 大野泰雄 …… 33  |
| 922A<br>KH31033      | 医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発                          | 藤本純一郎 …… 43 |
| 923A<br>KH31034      | 創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立    | 井上 達 …… 48  |
| 924A<br>KH31035      | 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究                                 | 合田幸広 …… 58  |
| 925A<br>KH31036      | 医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究 | 頭金正博 …… 67  |
| 926A<br>KH31037      | 多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発                          | 山崎利雄 …… 74  |
| 927A<br>KH31038      | 食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立                | 山本茂貴 …… 83  |
| 928A<br>KH32081      | DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究                       | 阿曾幸男 …… 90  |

## 第4分野

|                 |                                      |             |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|
| 929A<br>KH41039 | ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立      | 小熊恵二 …… 97  |
| 930A<br>KH41040 | 小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究        | 奥山虎之 …… 101 |
| 931A<br>KH42074 | 熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究                 | 名和行文 …… 105 |
| 932A<br>KH42075 | 新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究 | 山崎俊夫 …… 115 |

## 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

研究要旨 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、抗高脂血症性、抗炎症性等を対象とした。

### 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
- (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 早川喜郎
- (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 戸塚 護
- (6) 東京大学大学院薬学系研究科 海老塚 豊

### A. 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、抗高脂血症性、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。

### B. 研究方法

#### B.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

抗高脂血症活性は、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測定した。本年度は、抗高脂血症作用物質としてサトイモより単離された糖脂質 DGDG について構造活性相関を検討するため、グリセロール部の脂肪酸が異なる DGDG を 25 種合成した。DGDG の合成についてはいろいろ報告があるがグリセロール部に選択的に脂肪酸を導入できる方法を用いた。D-galactose より常法によりフッ化糖を合成し $\alpha\beta$ ミックスのままアセトナイド保護した誘導体とグリコシル化反応を行ない、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離して $\alpha$ 体を得た。次にベンジル基を除去してアセチル基へと付け替えた。その後ブロム化糖へと変換して D-mannitol から合成した、Dibenzyl-*sn*-glycerol と反応させて、選択的に $\beta$ アノマーを得た。グリセロール部を導入したのは以前の MGDG の方法と同様に保護、脱保護を行なった。グリセロール部のベンジル基を脱保護したのちアセトナイドで保護した。糖部分の保護基をアセチルから MPM 基へと変換した。グリセロール部のアセタールを脱保護したのち、TBDPS 基、THP 基により選択的にそれぞれ *sn*-1 位、*sn*-2 位を保護した化合物を得た。次に TBDPS 基のみ除去したのち *sn*-1 位にアシル基を導入した。THP 基の脱保護を行なったのち、*sn*-2 位にアシル基を導入した。続いて、最後に CAN で MPM 基の除去を行ない、グリセロール部の *sn*-1, *sn*-2 位に異なる脂肪酸を導入した DGDG を合成した。*sn*-1, *sn*-2 位に同じ脂肪酸を持つ DGDG はグリセロール部のアセタールを脱保護した化合物のアシル化を行ない続いて CAN で MPM を除去することで得られた。導入

する脂肪酸については、サトイモより単離された DGDG の構成脂肪酸である、リノール酸、リノレン酸、オレイン酸、パルミチン酸を、藍藻から単離された DGDG には多く見られるミリスチン酸を選んだ。ジガラクトシルグリセロールは上記合成中間体の保護基の脱離により得た。

次に、9 種のブラジル産植物 *Cordia salicifolia* Chamisso、*Stevia rebaudiana* Bertoni、*Phyllanthus niruri* L.、*Pilocarpus micrphyllus* Stapf、*Quassia amara* Lineu、*Echinodorus macrophyllus* Kunth、*Zingiber officinalis* Lineu、*Periandra dulcis* Martius、*Cayaponia tayuya* Martius について各 3 g を 30 mL の 50% エタノールで 60~70°C で 5 時間抽出し、濃縮乾固したものおよび、のブラジル産生薬 *Ilex paraguariensis*、*Paffia paniculata*、*Maytenus ilicifolia*、*Trichilia catigua*、*Uncaria tomentosa*、*Myrcia uniflora*、*Paullinia cupana*、*Cynara scolymus*、*Myrciana dubia*、*Malpighia glabra*、*Tabebuia avellaneda* 由来の健康食品をエタノールで室温抽出し、抗高脂血症活性についてスクリーニングを行った。また、昨年度に引き続き、ローレルからの活性成分の検討を行った。

### B.2 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

まず、ACT の吸収代謝を検討するため、リンゴ由来プロシアニジン画分を 8 週令ウイスター系ラット（1 群 4 匹）に 1g/ Kg となるように経口投与後、経時的に全量採血し、血しょうを得た。次に、C18 Sep Pak カートリッジを用いて固相抽出し、LC/ MS/ MS による分析を行った。LC/ MS/ MS 分析はリンゴ由来プロシアニジン画分から精製した各種プロシアニジン類（PB1、PB2、PC1、cinnamtannin A2、pentamer）から決定された MRM 条件で行い、各成分を選択的に検出した。

次に、ACT が腸管免疫系の影響及び全身免疫系へ作用する可能性を検討するために、ACT を経口的に感作状態にすることが可能である肥満細胞遺伝的欠損マウス（W/W<sup>v</sup> マウス）に自由経口摂取させて、その影響を検討した。9 週齢の雌性 W/W<sup>v</sup> マウスに OVA 1mg/匹を 9 週間連日経口投与し、9 週後に全採

血を行い血清中 OVA 特異的抗体価(IgE, IgG1 及び IgG2a)を測定した。ACT は 1%濃度で純水に溶解したものを OVA の連続経口投与開始の 1 週間前から IEL 及び脾細胞採取の日まで自由に摂取させた。対照群には純水を投与させた。9 週間後脾臓を摘出して細胞懸濁液（5.0×10<sup>6</sup> cells/ml）を調製し、培養プレートに分注し、*in vitro* において卵白アルブミン（OVA）を最終濃度 100 ppm となるよう添加して、培養温度 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件下で 3 日間培養し、脾細胞より産生された培養上清中のサイトカイン（IL-5,IL-6,IL-12,IL-2 及び IFN- $\gamma$ ）濃度を ELISA で定量した。対照群には生理食塩水を添加した。さらに、小腸から腸管上皮細胞間リンパ球(IEL)を分離精製し、フローサイトメーター(FCM)による表面抗原解析、血清中抗体価とマウスから摘出した脾臓由来の培養脾細胞から産生される各種サイトカインを指標に、腸管免疫系を介した全身免疫系に及ぼす影響について検討した。雌性 W/W<sup>v</sup> マウス（6 週齢）に 1%濃度で水に溶解して調整した培養温度 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件で培養し、3 日、7 日後に培養液を回収し各種サイトカイン産生を ELISA 法により測定した。脾臓 T 細胞などの全身免疫系 T 細胞が T 細胞レセプター（TCR<sub>γ</sub>）を発現し、CD4、CD8 分子の発現により 2 つのサブセット（TCR<sub>γ</sub><sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、TCR<sub>γ</sub><sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>）に分類されるのに対し、腸管上皮内リンパ球（IEL）は TCR<sub>γ</sub>陽性細胞が約半分を占め、CD4、CD8 $\alpha$ 鎖、CD8 $\beta$ 鎖の発現とあわせて 5 つのサブセット（TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>、TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>）に分類される。これらのサブセットの割合に対する ACT 経口投与による影響を検討した。

### B.3 $\beta$ -カロテン経口摂取による即時型アレルギー抑制作用に関する解析と評価

6 週令雌 BALB/c マウスに OVA を水酸化アルミニウムゲルと共に腹腔内投与（1 次免疫）し、10 日後に同様に投与（2 次免疫）を施した。2 次免疫から 1 週間後に血清中 OVA 特異的抗体価（IgE,IgG<sub>1</sub> 及び IgG<sub>2a</sub>）を測定した。その後、10  $\mu$ g/mL OVA 200  $\mu$ L を腹腔内投与して、能動的全身性アナフィラキ

シーショック (ASA) を誘導し、1 分毎に体温を測定した。次いで惹起後 7 分で全採血を行い、血清中ヒスタミン濃度測定を行った。また脾細胞懸濁液 ( $5 \times 10^6$  cells/mL) を調製後、 $100 \mu\text{g OVA/well}$  共存下、 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  濃度 5 % の条件下で 3 日間培養し、脾細胞より産生された培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定した。さらに脾細胞懸濁液から RNA を精製し、RT 後、Real-time PCR 法により IFN- $\gamma$  の mRNA を定量的に分析した。 $\beta$ -カロテンの吸収の指標として、肝臓中 $\beta$ -カロテン量を HPLC で測定した。 $\beta$ -カロテンは MF 粉末飼料に混合 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) して、1 次免疫の 2 週間前から約 1 ヶ月自由摂取させた。実験は全て雌性 BALB/c マウス 6 週齢を用い、1 週間以上国立医薬品食品衛生研究所動物舎において予備飼育した後、実験に供した。予備飼育から実験中を通して、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5 \%$  に保たれた SPF 環境下のチップゲージで飼育し、食餌(CRF-1, オリエンタル酵母), 飲水は全て自由摂取とした。

#### B.4 複合糖質コンドロイチン硫酸の抗アレルギー活性評価

雌性 BALB/c マウスに OVA 及びそのハプテン抗原である DNP-OVA の 2 種の抗原を用いて免疫感作を行い、2 次免疫応答後にマウス眼底より採血し、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 抗体価を測定した。コンドロイチン硫酸 (CS ; CS-C : 平均分子量 15 kDa) 経口投与は、1 次抗原感作から  $400 \text{ mg/kg}$  の濃度で 1 日 1 回行った。実験は全て雌性 Balb/c マウス 6 週齢(日本チャールズリバー)を用い、1 週間以上国立医薬品食品衛生研究所動物舎において予備飼育した後、実験に供した。予備飼育から実験中を通して、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5 \%$  に保たれた SPF 環境下のチップゲージで飼育し、食餌(CRF-1, オリエンタル酵母), 飲水は全て自由摂取とした。さらに、予備的な検討の結果、CS を  $400 \text{ mg/kg}$  で 1 日 1 回経口投与したマウスにおいて、抗原特異的 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 抗体価に抑制傾向が認められたものの、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して統計学的な有意差が認められなかったことから、CS の経口投与開始時期を抗原 1 次感作の 1 週間前からに変更し、更に給水瓶中に 2%CS(CS-C, 平均分子量 31 kDa)を加え、

マウスに任意に摂取させ、同様の実験を試みた。また、DNP-OVA による 2 次感作 9 日後のマウスの両耳介に DNP-OVA の擬似抗原として塩化ピクリルを塗布し、接触性アレルギーを惹起させ、CS 経口投与によるマウス耳介肥厚に及ぼす影響を調べた。

#### B.5 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

これまでに、卵アレルギーである卵白アルブミン (OVA) に特異的な TCR 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) 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。また、このマウスに卵白食を自由摂取させた場合に IEL のサブセット構成が変化することをこれまでに明らかにしている。さらに、OVA23-3 マウスの導入遺伝子由来 TCR と同じ抗原決定基 (OVA323-339 残基領域) を認識する TCR 遺伝子を導入した DO11.10 マウスを用いた場合にも、IEL において同様の変化が認められることが明らかとなっている。

本研究ではまず、DO11.10 マウスに卵白食を自由摂取させた場合に対照食 (カゼインを 20%含む飼料:カゼイン食) を摂取させた場合と比較して、IEL において mRNA の発現がどのように変化するかについて、Affymetrix 社の GeneChip®システムを用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。すなわち、DO11.10 マウスに卵白食、あるいはカゼイン食を 3 日間あるいは 7 日間自由摂取させた後、各群のマウス小腸から反転小腸法により粗精製 IEL を調製した。粗精製 IEL からセルソーターを用いて TCR<sub>+</sub> あるいは TCR<sub>-</sub>である画分を精製し、これを Whole IEL とした。調製した細胞から全 RNA を抽出し、Affymetrix 社推奨のプロトコールに従い、GeneChip® (Murine Genome U74Av2 Array) を用いて遺伝子発現解析を行った。

また、卵白食群あるいは対照食群の DO11.10 マウスから調製した IEL から、セルソーターを用いて細胞表面分子の発現パターンによって分類される

IEL の各サブセット (CD4<sup>+</sup>、CD8αα<sup>+</sup>、CD8αβ<sup>+</sup>) を分離精製した。また、同様に腸間膜リンパ節細胞 (MLN) から、CD4<sup>+</sup>、CD8αβ<sup>+</sup> の各サブセットを分離精製した。さらに、一部の実験においては BALB/c マウスの IEL、MLN、パイエル板細胞 (PP) と脾臓細胞 (SPL) を調製し、MACS 法を用いて CD4<sup>+</sup>細胞と CD8<sup>+</sup>細胞を精製した。

DNA マイクロアレイ解析において発現差の大きかった遺伝子については、上記のように調製した各細胞における mRNA 発現を、定量的 RT-PCR 法により解析した。すなわち、調製した細胞から全 RNA を抽出した後、これに含まれる mRNA に相補的な RNA (aRNA) を、in vitro 転写反応による RNA 増幅で得た。これを鋳型として逆転写反応を行い cDNA を得た。各遺伝子に特異的なプライマーセットを用い、LightCycler™ を用いて定量的 RT-PCR 法による解析を行った。また、調製した細胞を固層化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体による刺激、あるいは PMA とイオノマイシンによる刺激を加え、72 時間後の培養上清中に産生されたサイトカイン量をサンドイッチ ELISA 法により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト試料は用いていないが、実験動物に対して所属機関の動物実験倫理委員会の定める規定に則り、動物愛護上の配慮を行っている。なお、ヒト由来ラノステロール合成酵素は、酵母で発現させたものを使用している。

## C. 研究結果と考察

### C.1 抗高脂血症作用を有する新機能素材の評価と探索

Table 1 のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性試験の結果より、DGDG のジミリスチン酸体が 0.5μmol で 72% という今回最も高い活性を示した。ついでジオレオイル体が同じ濃度で 57% の阻害率を示した。傾向として sn-1 位にオレイン酸があるものの活性が高かった。DGDG は MGDG よりも酵素阻害活性が高く、またアシル基を持たない化合物には活性がなかった。これらの結果より活性発現のためにはアシル基とジガラクトシル部分の両方が必要だと考えられた。C14 のミリスチン酸と C18Δ1 のオレ

イン酸はほぼ同程度の直線上の長さを持つ。両者がどちらも同程度の強い活性を示したことを考慮すると、溶液中で同じようなコンフォメーションをとっているかも知れない。なお、MGDG についてはオレイン酸を持つものが高い抗発癌プロモーター活性を示すことがわかっており抗高脂血症作用との関連について興味を持たれる。

ブラジル産植物エキスについては *Periandra dulcis*、*Pilocarpus micrphyllus*、*Zingiber officinalis* が今回行なった中で比較的高い活性を示した。またブラジル生薬健康食品については *Trichilia catigua*、*Paffia paniculata*、*Maytenus ilicifolia* が高い阻害活性を示した。なお、これらの植物についての成分研究としては、*Trichilia catigua*、*Paffia paniculata* 主成分としてサポニンが含まれていることが判明している。ローレルからは、新たに、5 種のセスキテルペン類を単離構造決定したが、昨年度報告した eremanthine の活性を上回るものはなかった。

### C.2 リンゴポリフェノールの抗アレルギー性の解析と評価

LC/MS/MS を用いた実験で、リンゴポリフェノールは、3 量体まで、経口投与したラットの血液中に移行していることが判明した。他方その量は、カテキン類と比較して僅かであった。また ACT 投与の in vivo での抗アレルギー活性は、カテキン類単独投与での活性より高く、ACT の構成成分 (エピカテキンの 1~15 量体) が相乗的な効果を持ちながら同活性を示すことが明らかとなっている。この様な知見を背景に、次に、腸管免疫系を介した全身免疫系への影響を検討した。実験動物としては、我々が見出した連続経口投与により感作が誘導できる W/W<sup>v</sup> マウスを用い、特に ACT 経口摂取の経口免疫誘導に及ぼす影響について検討した。まず、W/W<sup>v</sup> マウスを用いた経口感作の検討では、血清中 OVA 特異的抗体価において、ACT 自由摂取群は対照群に比べて血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価、IgG1 抗体価及び IgG2a 抗体価がすべて低い傾向がみられた。また、IgE 抗体価減少の影響に関しては、ACT の経口摂取は濃度依存性が観察された。また、培養脾臓細胞のサイトカイン濃度を測定した

ところ、ACT 摂取群は対照群と比べ IL-2、IL-12 及び IFN- $\gamma$  産生には大きな変化がみられなかったが、IL-5 及び IL-6、IL-10 産生は抑制された。このことから、ACT 摂取すると OVA の経口感作が抑制されることが示唆された。腸管上皮内リンパ球 (IEL) のサブセット解析においては、ACT 摂取群は対照群と比べ TCR $\gamma\delta$  陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。以上の事から、ACT は経口感作誘導による TCR $\gamma\delta$ -Tcell の減少を抑制することにより、経口感作を抑制し、経口免疫寛容を誘導する可能性が示唆された。

### C.3 $\beta$ -カロテン経口摂取による即時型アレルギー抑制作用に関する解析と評価

飼料中の $\beta$ -カロテンの安定性を検討するために、HPLC で分析した結果、実験期間中における飼料中の $\beta$ -カロテン量には変動がなかった。また $\beta$ -カロテン投与群においては、対照群に比べ肝臓中の $\beta$ -カロテン量が高値をしめしたことから、 $\beta$ -カロテン投与群は有意に $\beta$ -カロテンが吸収されていることが判明した。また実験期間中における両群における体重増加、飼料摂取量において有意な差はみられなかった。

血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価および IgG<sub>1</sub> 抗体価において、 $\beta$ -カロテン摂取群は対照群に比べて有意に低かった。一方 IgG<sub>2a</sub> 抗体価において、 $\beta$ -カロテン摂取群は対照群に比べ、有意に高値であった。ASA 誘導後、 $\beta$ -カロテン摂取群では対照群と比較して、体温低下率及び血清中ヒスタミン濃度が有意に低値であった。脾細胞採取後の IFN- $\gamma$  の mRNA 量は $\beta$ -カロテン摂取群が対照群に比べ、有意に増加していた。また OVA 共存下で培養した脾細胞より産生されたサイトカイン量を測定したところ、 $\beta$ -カロテン摂取によって Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  産生は有意に促進され、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-5 等の産生は有意に抑制された。以上の結果より、 $\beta$ -カロテン摂取は、免疫感作により Th2 側にシフトした Th1/Th2 バランスを Th1 側へ調節にすることで、即時型アレルギー反応を抑制することが示唆された。

### C.4 複合糖質コンドロイチン硫酸の抗アレルギー活性評価

2 次免疫応答の 7 日後に血清を採取し、生理食塩水を投与したコントロール群の血清と比較したところ、CS 経口投与群の血清中抗原特異的 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 抗体価が抑制される傾向が認められた。なお、免疫を施さなかったマウス(vehicle 群)の抗原特異的抗体価が殆ど 0 に近いことを確認した。また、CS を 400 mg/kg で 1 日 1 回経口投与したマウスにおいて、抗原特異的 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 抗体価に抑制傾向が認められたものの、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して統計学的な有意差が認められなかったことから、CS の経口投与開始時期を抗原 1 次感作の 1 週間前からに変更し、更に給水瓶中に 2%CS(CS-C, 平均分子量 31 kDa)を入れてマウスに任意に摂取させ、同様の実験を試みた。CS を任意に摂取させた群は、コントロール群と比較して OVA 特異的 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 抗体価の有意な抑制が認められた。平成 14 年度報告において CS の経口投与により血清中抗原特異的抗体価が抑制されたことをふまえ、OVA 感作マウスに抗原過剰投与によるアナフィラキシー反応を惹起させ、肥満細胞から血清中に遊離されたヒスタミン量を OPA(*o*-フタルアルデヒド)を蛍光誘導化試薬に用いた HPLC で定量した。その結果、CS 投与群は、生理食塩水を経口投与したコントロール群と比較して、血清中ヒスタミンの遊離が低くなる傾向が認められた。さらに DNP-OVA による 2 次感作 9 日後のマウスの両耳介に DNP-OVA の擬似抗原として塩化ピクリルを塗布し、接触性アレルギーを惹起させた。塩化ピクリルを塗布した 1 時間後の耳介肥厚を測定したところ、非免疫感作マウス(vehicle 群)の耳介の厚さと比較して、生理食塩水を経口投与したコントロール群の耳介が約 4~5 倍に上昇したのに対し、CS 経口投与群では 1.5~2 倍と、肥厚が有意に抑制された。これらの結果から、CS 経口摂取による接触性アレルギーに対する抑制効果が示唆された。

### C.5 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

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、IEL が特異的に認識する抗原を経口投与した場合に、IEL に生じる遺伝子発現の変化を

解析した。すなわち、3日間卵白食を摂取（OVA 摂取量は1匹あたり一日に約200 mg）あるいは対照食としてカゼイン食を摂取した DO11.10 マウスから調製した Whole IEL における mRNA の発現を、約12000種のプローブ DNA が含まれている DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、特に Ki-67 抗原やトポイソメラー II 及びサイクリンに代表される細胞増殖および細胞周期に関わる遺伝子の発現が、卵白食摂取により大きく増加しており、免疫機能に関連する遺伝子の発現上昇も顕著に認められた。その他、シグナル伝達、アポトーシス、代謝、転写に関わる遺伝子においても発現の変化が認められた。また、卵白食摂取により、IEL で発現が有意に増加あるいは減少したのものとして、機能未知な遺伝子（EST）も多数認められた。今後、これらの EST の実体を明らかにし、その遺伝子の機能を明らかにすることにより、IEL の生理機能の解明に役立つものと期待される。上記のいくつかの代表的な遺伝子について定量的 RT-PCR 法を用いて解析を行った結果、卵白食群と対照食群の間の発現差が確認された。

免疫機能に関連する遺伝子として特に卵白食摂取による発現上昇が顕著であったのは、インターロイキン 10（IL-10）遺伝子であった。IL-10 遺伝子の発現上昇は、7日間の卵白食投与によっても認められた。また、卵白食あるいは対照食を7日間自由摂取させた DO11.10 マウスから Whole IEL を調製し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激を加えた後の培養上清中の IL-10 量を測定したところ、卵白食群で IL-10 の分泌量が増加しており、遺伝子発現で得られた結果との一致がみられた。

次に、IEL の各サブセットにおける IL-10 遺伝子の発現を解析した結果、CD4<sup>-</sup> IEL において強い発現が認められたのに対し、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> IEL、CD8 $\alpha$  $\alpha$ <sup>+</sup> IEL では発現は認められなかった。また、CD4<sup>-</sup> IEL を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激した培養上清中には、IL-10 の分泌が認められた。しかしながら、CD4<sup>-</sup> IEL 単独での IL-10 の発現は、mRNA 発現あるいは培養上清中への分泌のどちらにおいても、卵白食群および対照食群の間に顕著な差は認められなかった。さ

らに、無処理の BALB/c マウスから調製した IEL および MLN、PP、および SPL から調製した T 細胞について IL-10 遺伝子の発現を検討したところ、PP の CD4<sup>+</sup>T 細胞でもわずかに発現が検出されたが、CD4<sup>+</sup> IEL において IL-10 遺伝子の発現が顕著に高かった。これらのことから、特異抗原の経口摂取によって IEL における IL-10 産生が促進されること、またその発現上昇には CD4<sup>-</sup> IEL が関与していることが示された。

#### D. 結論

1) サトイモ中の抗高脂血症作用本体 DGDG、MGDG の合成を行い、任意の位置に任意の脂肪酸を導入した DGDG の合成法を確立した。得られた化合物について抗高脂血症活性を測定したところ、ジガラクトシルグリセロールに一定の長さのアシル基をもつ DGDG が強い活性を示した。また、数種のブラジル産植物抽出物が、抗高脂血症活性を持つことを明らかにした。

2) ACT の抗型アレルギー活性は、経口感作誘導による TCR $\gamma$  $\delta$  Tcell の減少を抑制することにより、経口感作を抑制し、経口免疫寛容を誘導するため生ずる可能性が示唆された。

3) ニンジンジュースの抗型アレルギー活性本体は、 $\beta$ -カロテンであり、同物質が Th2 側にシフトした Th1/Th2 バランスを Th1 側へ調節することで、即時型アレルギー反応を抑制することが示唆された。

4) 即時型アレルギーに対する CS の経口的活性を評価したところ、同反応に抑制が認められた。またこれらの活性は、Th2 型タイプのサイトカイン抑制によるもので、能動的な全身性の過剰免疫抑制による可能性が示唆された。

5) 食品アレルギーの動物モデルにおいて、食品アレルギーを経口摂取した際に、IEL で生じる変化を、遺伝子発現の変化という観点から明らかにした。その結果、特異抗原の経口摂取により IEL において細胞増殖・細胞周期関連の遺伝子、免疫機能関連遺伝子の発現が増大していることが明らかとなった。特に免疫応答抑制機能を有する IL-10 遺伝子の発

現上昇が顕著に認められること、IEL サブセットのうち CD4<sup>+</sup>IEL が IL-10 の産生に寄与していることが明らかとなった。これらの結果より、IEL は食品アレルゲンなど腸管腔に由来する抗原の侵入に反応し、何らかの生理機能を果たすこと、CD4<sup>+</sup>IEL は腸管における免疫応答に対して抑制的な作用をもつことが示唆された。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Murakami, R., Yamada, K., Nagafuchi, S., Hachimura, S., Takahashi, T., Kaminogawa S., Totsuka M.: Nucleotides enhance the secretion of interleukin 7 from primary-cultured murine intestinal epithelial cells. *Cytotechnology*, 40, 59-65 (2003).
2. Goto, M., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., Totsuka, M., Ishikawa, H., Kaminogawa, S.: Antigen feeding enhances frequency and antigen-specific proliferation ability of intraepithelial CD4<sup>+</sup> T cells in T cell receptor transgenic mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 1223-1229 (2003).
3. Oshima, S., Suganuma, H., Inakuma, T., Effect of carrot juice drinking on human serum cholesterol level, *Jpn. J. Food Chem.* 10, 22-28 (2003).
4. Oida, T., X. Zang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, H. L. Weiner: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> "T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-induced colitis by a TGF- $\beta$ -dependent mechanism" *Journal of Immunology*, 170, 2516-2522 (2003).
5. Shoji, T., Mustuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H., Goda, Y., "Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chemistry*, 51, 3806-3813 (2003).
6. Okunuki, H., Teshima, R., Harikai, N., Sakai, S., Akiyama, H., Maitani, T., and Sawada J., "Oral Sensitization of W/W<sup>v</sup> Mice with Ovalbumin and Possible Involvement of the Decrease in  $\gamma \delta$ -T Cells" *Biol. Pharm Bull.* 26, 1260-1265 (2003).
7. N. Kawahara, M. Inoue, K.-i. Kawai, S. Sekita, M. Satake, Y. Goda "Diterpenoid from *Salvia greggii*" *Phytochemistry*, 63, 859 (2003).
8. Yanagida, A.; Shoji, T.; Shibusawa, Y. Separation of polymerized polyphenols by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 56, 311-322 (2003).
9. Kano, H., Ametani, A., Totsuka, M., Kaminogawa, S.: Murine T cell lines can change CD25 expression patterns as well as proliferation and cell death patterns in response to interleukin 2. *Cytotechnology*, in press.
10. Hibi, M., Hachimura, S., Ise, W., Sato, A., Yoshida, T., Takayama, T., Sasaki, K., Senga, T., Hashizume, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S.: Dendritic cells from spleen, mesenteric lymph node and Peyer's patch can induce both production of IL-4 and IFN- $\gamma$  of naive CD4<sup>+</sup> T cells in their primary culture, depending on antigen doses. *Cytotechnology*, in press.
11. Yoshida, T., Hachimura, S., Ishimori, M., Ise, S., Totsuka, M., Ametani, A., Kaminogawa, S.: Interleukin 12 and CD86 regulate T helper type 1 and type 2 development induced by various doses of antigen in the antigen presentation by Peyer's patch and spleen cells. *Cytotechnology*, in press.
12. Sakano, Y., Mutsuga, M., Tanaka, R., Suganuma, H., Inakuma, T., Toyoda, M., Goda, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., "Inhibition of Human Lanosterol Synthase by the Constituents of *Colocasia esculenta* (taro)" *Biol. Pharm. Bull.*, accepted
13. Akiyama, H., Sakai, S., Linhardt, R.J., Goda, Y., Toida, T., Maitani, T., "Chondroitin sulphate structure affects its immunological activities on murine splenocytes sensitized with ovalumin" *Biochemical J.*, submitted.
14. Sato, Y., Akiyama, H., Suganuma, H., Watanabe, T., Nagaoka, M., Inakuma, T., Goda, Y., Maitani, T., "The Feeding of  $\beta$ -Carotene Down-Regulates Serum IgE Levels and Inhibits the Type I Allergic Response in Mice" *J. Allergy Clin. Immunol.*, submitted.

口頭発表

- 1) 田中理恵、坂野勇一、六鹿元雄、菅沼大行、稲熊隆博、永津明人、渋谷雅明、海老塚豊、合田幸広: 糖脂質 MGDG, DGDG のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について 日本薬学会第 123 回年会 (長崎) (2003.3).
- 2) 酒井信夫、高橋真弓、穂山浩、豊田英尚、戸井田敏彦、米谷民雄、今成登志男: コンドロイチン硫酸糖鎖構造と免疫化学的活性の構造活性相関 日本薬学会第 123 年会 (長崎) (2003.3).
- 3) 穂山浩、庄司俊彦、佐藤雄嗣、澤口貴仁、酒井信夫、渡邊敬浩、神田智正、合田幸広、米谷民雄: リンゴ縮合型タンニンの全身性免疫系に及ぼす影響 日本薬学会第 123 年会 (長崎) (2003.3).
- 4) 加藤晴康、大塚淳二、岩崎のぞみ、山田潔、戸塚護、上野川修一: DNA マイクロアレイを用いた小腸上皮内リンパ球における遺伝子発現解析. 2003 年度日本農芸化学会 (藤沢)、(2003.4).
- 5) 岩崎のぞみ、山田潔、上野川修一、戸塚護: 食餌抗原摂取による小腸上皮内リンパ球の遺伝子発現変化の解析. 2003 年度日本農芸化学会 (藤沢)、(2003.4).
- 6) 佐藤香奈子、山田潔、上野川修一、戸塚護: マウス胎仔小腸上皮由来初代培養細胞の免疫学的特性の解析. 2003 年度日本農芸化学会 (藤沢)、(2003.4).
- 7) 伊勢涉、清水暢子、戸塚護、八村敏志、上野川修一: Naive CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生に lipid raft が果たす役割. 2003 年度日本農芸化学会 (藤沢)、(2003.4).
- 8) 市川晋太郎、八村敏志、佐藤あゆ子、加地知弘、伊勢涉、戸塚護、上野川修一: 抗原提示細胞 (APC) により提示されている抗原の検出系の確立とこれを用いた *in vivo* における抗原提示の解析. 2003 年度日本農芸化学会 (藤沢)、(2003.4).
- 9) 田中理恵、坂野勇一、永津明人、渋谷雅明、海老塚豊、合田幸広: 糖脂質のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について 日本生薬学会第 50 回年会 (東京) (2003.9).
- 10) 小谷康介、山田潔、岩崎のぞみ、加藤晴康、上野川修一、戸塚護: 特異抗原の経口投与による小腸上皮内リンパ球の遺伝子発現変化の解析. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)、(2003.12).
- 11) 森下聡、山田潔、佐藤香奈子、上野川修一、戸塚護: マウス胎仔由来初代培養小腸上皮細胞の菌体成分に対する応答. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)、(2003.12).
- 12) 小谷康介、山田潔、岩崎のぞみ、上野川修一、戸塚護: 食品抗原摂取による小腸上皮内リンパ球のサイトカイン産生の変化. 2004 年度日本農芸化学会 (広島)、(2004.3).
- 13) 森下聡、山田潔、佐藤香奈子、鎌田啓明、上野川修一、戸塚護: 初代培養マウス小腸上皮細胞の菌体成分刺激に対する免疫関連分子の発現応答. 2004 年度日本農芸化学会 (広島)、(2004.3).
- 14) 加地 (高東) 留美、伊勢涉、戸塚護、上野川修一、八村敏志: 抗原刺激により誘導される Naive CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン発現を制御する TCR シグナル伝達経路の解析. 2004 年度日本農芸化学会 (広島)、(2004.3).
- 15) 三枝静恵、戸塚護、上野川修一、細井知弘: 酪酸は酵母に対する Caco-2 細胞のサイトカイン応答を修飾する. 2004 年度日本農芸化学会 (広島)、(2004.3).
- 16) 田中理恵、清水賢、渋谷雅明、海老塚豊、合田幸広: ローレルのヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について 日本薬学会第 124 年会 (大阪) (2004.3).
- 17) 佐藤雄嗣、穂山浩、渡邊敬浩、長岡恵、庄司俊彦、神田智正、合田幸広、米谷民雄: リンゴプロシアニジン画分経口摂取のオボアルブミン経口感作に及ぼす影響」日本薬学会第 124 年会 (大阪) (2004.3).
- 18) 穂山浩、佐藤雄嗣、菅沼大行、渡邊敬浩、長岡 (浜野) 恵、稲熊隆博、合田幸広、米谷民雄:  $\beta$ -カロテン経口摂取による即時型アレルギー抑制作用 日本薬学会第 124 年会 (大阪) (2004.3).

9月4日

「免疫調節剤」特願平 10-244578 出願日 2003

年9月5日

F. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

「免疫制御剤」特願 2003-244578 出願日 2003 年

---

平成15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16年9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