

健康食品の有効性評価基準に関係した素材中成分の体内動態解析に関する基礎的検討

分担研究者 梅垣敬三 独立行政法人国立健康・栄養研究所

研究協力者 田邊宏樹 独立行政法人国立健康・栄養研究所

研究要旨

新しい特定保健用食品の規格基準を作成する上での方向性を示唆するデータを得るため、いわゆる健康食品の中でも利用実績がある、イチョウ葉エキスならびにウコンを取り上げ、その素材中に含まれている成分の中で有効性や安全性の評価に重要な成分分析を行った。その結果、イチョウ葉エキス素材中の主要なフラボノイドであるクエルセチン量には入手した素材間であまり差異は確認されなかったが、主要なテルペノイドであるピロバライド量は、各素材間でばらつきが確認された。ピロバライドは肝臓薬物代謝酵素の誘導において重要であると考えられる成分であった。また、ウコンの主要成分であるクルクミノイド量とともに、各種ミネラル量においても、各種素材間のばらつきが確認された。これらのことは、いわゆる健康食品として流通している素材のレベルにおいても、その成分含量が一定していないことを示唆した。以上のように、いわゆる健康食品として人気のある素材であっても、生体影響に重要な成分は、素材レベルで特定して規格基準を作成することが、その素材を添加した食品の有効性や安全性を確保する上で重要であると考えられた。

A. 目的

いわゆる健康食品として流通している健康食品素材は、複数の成分から構成されるものが多い。そのような素材成分を特定保健用食品として許可していくためには、素材中に含まれている成分の中で、少なくとも有効性や安全性に関与する重要な各成分を明確にすることが必要である。現状において、例えばハーブなどでは素材中の含有量も明確でない1成分が取り上げられ、その若干の研究から得られた有効性情報が拡大解釈されて「いわゆる健康食品」として流通している実態がある。いわゆる健康食品では含有される複数成分の相互作用において、健康効果を示すという考え方もあるが、まず利用さ

れた素材の成分含量がある程度明確にされていなければ、効果を期待するための必要な摂取量は設定できない。また場合によっては有効性を考える前に安全性が危惧される。そのため製品に添加される素材の成分規格基準を設定するために重要な成分情報をどのように検討し、またどのように規格を作成していくかという方向性を示すことが求められる。次に、それらの素材が添加された食品を摂取したとき、素材中の成分の体内吸収が推定できる必要がある。全ての成分の体内への吸収を現時点で評価することは困難であり、現実的ではないことから、重要と考えられる成分をマーカーとして把握することが妥当な対応方法と考えられる。このようなマ

ーカーを明らかにすることで、素材の摂取量と生体影響の関連をある程度評価することが可能となり、有効で安全な利用を図ることもできるようになる。現時点では、それが可能かどうかは明確にはなっていない。そこで本研究では、新しい特定保健用食品の規格基準を作成する上での方向性を示唆するデータを得るため、1) 素材中に含まれている成分の中で、少なくとも有効性や安全性の評価に重要な各成分の検討、2) 素材中の成分で体内吸収や生体への影響が推定できる成分の体内濃度に関する検討を行なうこととした。対象とした素材としては、これまでヒトにおいて有効性が示唆されて利用実績があり、特定保健用食品の新たな基準作成の可能性が高いものとしてウコン、ならびにイチョウ葉エキスを取り上げた。

B.研究方法

各種イチョウ葉エキスは表 1.に示したものを使用し、各種ウコンエキスは、表 2.に示したものを使用した。

ミネラル量の測定は、ナトリウムとカリウムを原子吸光度法、リンと鉄、カルシウムとマグネシウム、銅と亜鉛、マンガンを ICP 発光分析法にてそれぞれ測定した。

HPLC による各種成分の測定は、島津製作所製 HPLC システム、もしくは米国 ESA 社の Coularray システムを用いて行った。

イチョウ葉エキス中の肝臓薬物代謝酵素の誘導成分に関する検討はイチョウ葉エキスを 6 種類のフラクションに分画し、6 週齢の ICR 系雄性マウス（日本クレア）に 5 日間経口投与し、肝臓の総 CYP 含量及び 6 種類の CYP 活性を測定して検討した。

C.研究結果

イチョウ葉エキスについて種々の素材を入手し、それらの有効成分の分析を行った。イチョウ葉エキスの有効成分としてはフラボノイド、

テルペノイドがある。イチョウ葉エキスのフラボノイドは配糖体になっているものが多いので、酸加水分解反応を行った試料について、HPLC 分析を行った（図 1.）。その結果、主要なフラボノイドであるクエルセチンに多少のばらつきが見られたが、ケンフェロールやイソラムネチンに差異はみられず、フラボノイド全体としては、あまり差異はなかった。

次に、イチョウ葉エキスのテルペノイド量を測定した（図 2.）。その結果、ギンコライドにはあまり差異はみられなかったが、主要なテルペノイドであるピロバライドには差異がみられ、大きなもので約 2 倍の差が確認された。

また、肝臓薬物代謝酵素を誘導するイチョウ葉エキス中の成分の解析を行った。種々の溶媒を用いてイチョウ葉エキスを 6 つのフラクションに分画し、マウスを用いた動物実験で検討し、その活性本体をピロバライドと推定した。

ウコンは、春ウコン 5 種類と秋ウコン 11 種類の計 16 種類について分析を行った。各種ウコン中のクルクミノイド量を測定した結果（図 3.）、クルクミノイド含有量が多いとされる秋ウコンにおいて、含有量の差が海外 Y 国と国内産で約 6 倍以上のものがあり、同一名称の各素材間での含有量に大きな差異が確認された。

また、春ウコン中にはミネラル分が多いとされているので、各種ウコンのミネラル含量を測定した結果（図 4-1~3.）、海外 X 国の秋ウコンのミネラル含量については同じような傾向がみられたが、国内の各素材間での差異が多くみられた。

D.考察

イチョウ葉エキスの有効成分としてはフラボノイド、テルペノイドという名称が一般的である。現在作成されている協会等の規格は、「フラボノイド類を 24%以上、テルペノイド 6%以上を含有し、ギンコール酸の含有量が 5ppm 以下」というものであるが、フラボノイドやテルペノ

イドは一般名であり、個別の成分名ではない。個別成分としてさらに詳細な、フラボノイドやテルペノイドの含量が重要と考えられる。今回、市販のイチョウ葉エキス素材の成分分析を行ったところ、フラボノイド類には大きな差異はなかったが、テルペノイドのひとつであるビロバライドは製品によって他の製品の2倍の濃度を示すものがあった。肝臓の薬物代謝酵素を誘導するビロバライドの素材中の含量に大きなバラツキがあることは、薬物との相互作用を生じる可能性がある。イチョウ葉エキスを安全に使用していくためには、素材中のビロバライド含量を明確にし、また体内への吸収の程度を評価することが重要であると考えられる。今現在、ビロバライドの生体への吸収が評価できる分析方法を検討している。

ウコンについては、数種類のを素材として分析し、有効成分と考えられるクルクミノイドを分析した。またウコン製品が鉄を過剰に含んでいたため、肝障害を悪化させたという報告事例があることから、ミネラルの分析も行った。その結果、クルクミノイドも産地や製品によってその含量にかなりの変動があること、成分規格で注目されていないミネラルについても素材のレベルでも一定していないことが明らかとなった。

E. 結論

いわゆる健康食品として流通し、人気がある素材のウコンやイチョウ葉エキスについて、その有効性や安全性を確保する上での素材中の注目できる成分を分析したところ、素材のレベルにおいても成分は産地等で一定していなかった。このような素材を添加した食品が特定保健用食品等として許可されるためには、まず生体影響を考慮したときの重要な成分を特定し、その素材レベルでの規格基準を作成して、基礎的な研究を蓄積することが必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

表1. イチョウ葉エキスサンプルの製造元と抽出方法

1	A社
2	B社
3	C社 EtOH抽出物
4	C社 Acetone抽出物
5	D社
6	E社
7	F社

表2. ウコンサンプルの製造元と産地

春ウコン1	G社	国内産
春ウコン2	H社	国内産
春ウコン3	I社	国内産
春ウコン4	J社	国内産
春ウコン5	K社	国内産
秋ウコン1	L社	国内産
秋ウコン2	H社	国内産
秋ウコン3	M社	国内産
秋ウコン4	K社	海外X国
秋ウコン5	N社	国内産
秋ウコン6	O社	海外Y国
秋ウコン7	P社	海外X国
秋ウコン8	Q社	国内産
秋ウコン9	R社	国内産
秋ウコン10	I社	国内産
秋ウコン11	J社	国内産

カラム: L-column ODS (4.6 mm φ × 250 mm)

オープン: 40°C

移動相 A 86 mM NaH₂PO₄、11 mg/L SDS、12% CH₃CN、2% MeOH
(pH 3.37 with H₃PO₄)

B 30 mM NaH₂PO₄、15 mg/L SDS、60% CH₃CN、10% MeOH
(pH 3.45 with H₃PO₄)

0~5 min ; 0 → 50%、5~15 min ; 50%、15~20 min ; 50 → 100%、20~30 min ; 100%

流速: 1.0 mL/min

検出: 電気化学検出 (0、50、100、150、200、300、400、500 mV)

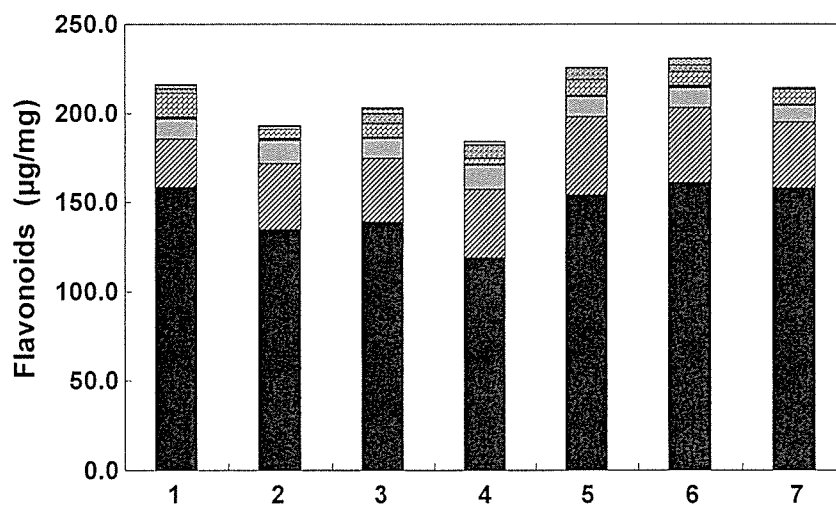


図1. イチョウ葉エキス中の各種フラボノイド測定条件と含有量

■: Quercetin、▨: Kaempferol、▩: Isorhamnetin、■: Luteolin、▨: Myricetin、▩: Taxifolin、▩: Isorhamnetin、□: Ruin

カラム: Imtakt Cadenza CD-C18 (4.6 mm φ × 250 mm)

オーブン: 40°C

移動相: Bilobalide MeOH:H₂O = 25 / 75

Ginkgolides MeOH:H₂O = 40 / 60

流速: 0.8 mL/min

検出: 蒸発光散乱検出器 (40°C, 350 kPa)

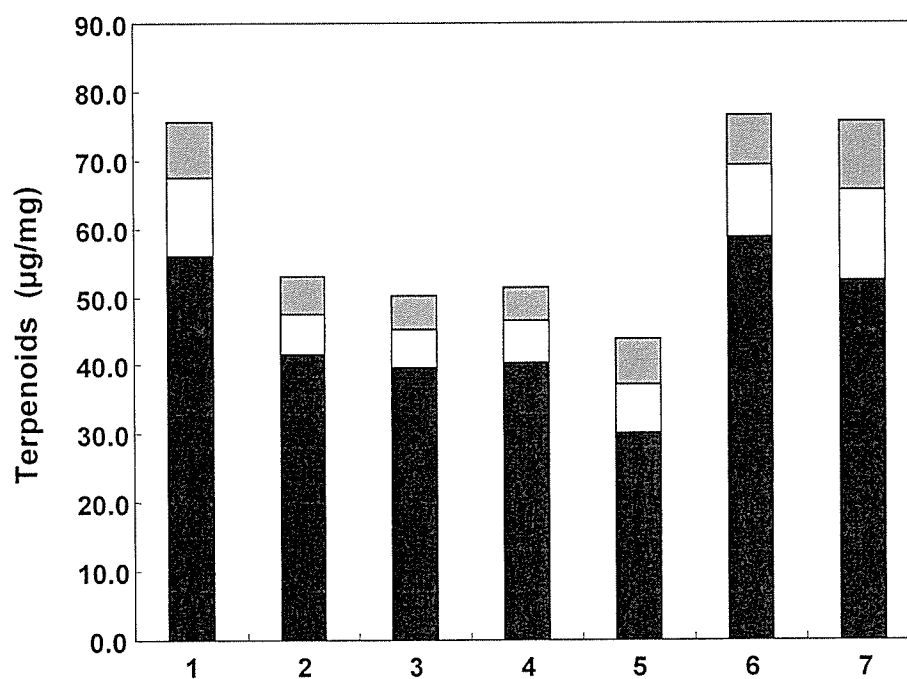


図2. イチョウ葉エキス中の各テルペノイド測定条件と含有量
■: Bilobalide、□: Ginkgolide A、▨: Ginkgolide B

カラム: Imtakt Cadenza CD-C18 (4.6 mm φ × 250 mm)

オープン: 37°C

移動相: CH₃CN:H₂O:HCOOH = 55 / 45 / 0.05

流速: 0.8 mL/min

検出: UV 420 nm

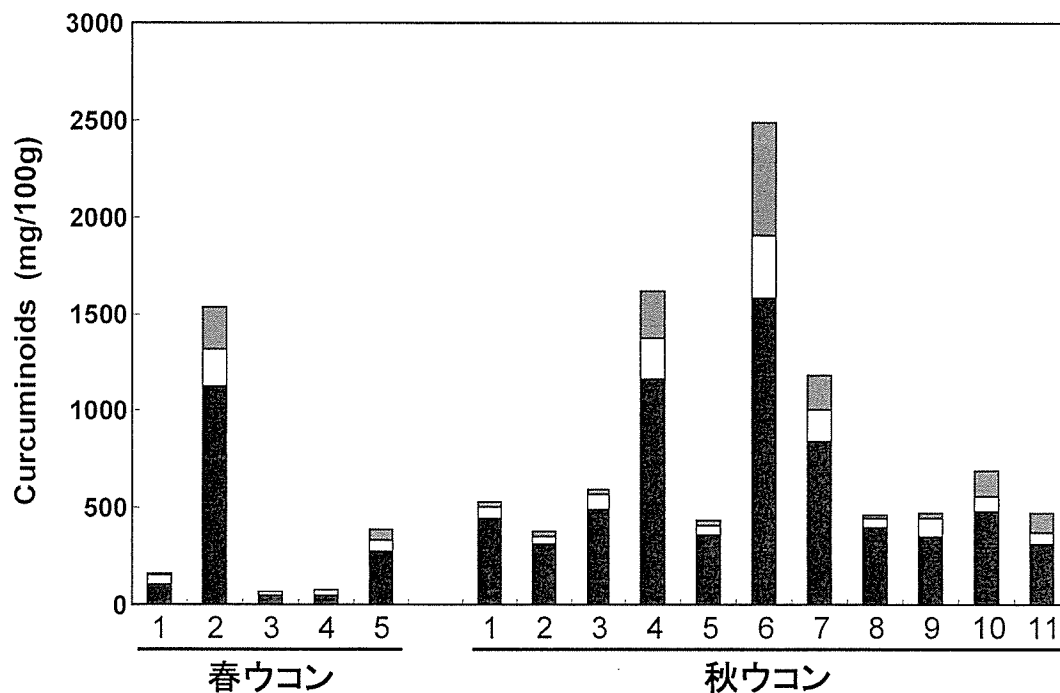


図3. ウコン中のクルクミノイド測定条件と含有量

■: Curcumin、□: Demethoxycurcumin、▒: Bisdemethoxycurcumin

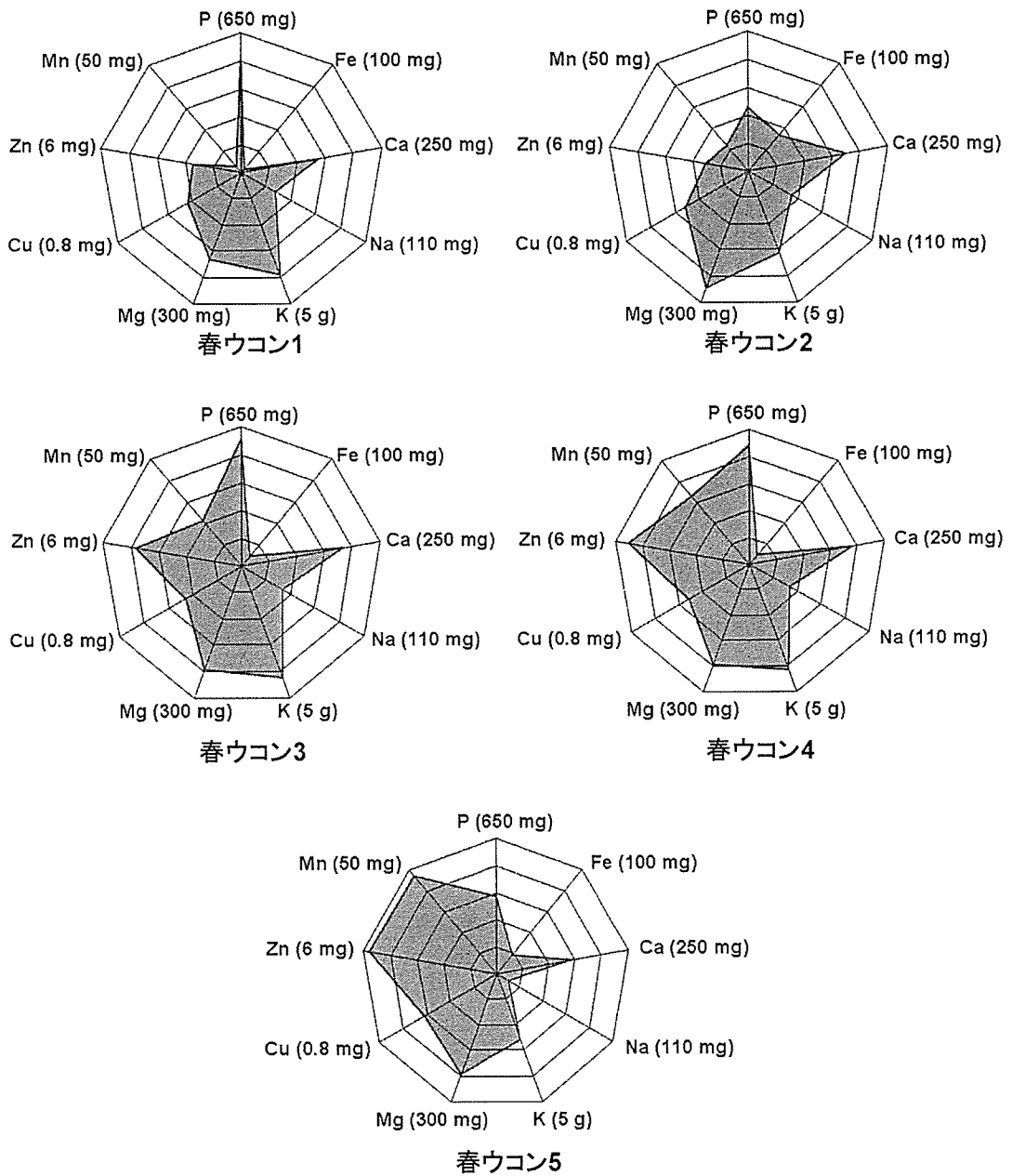
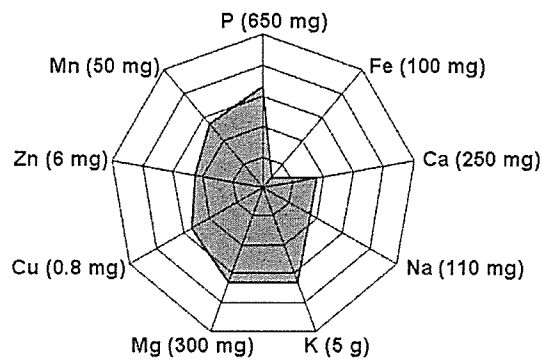
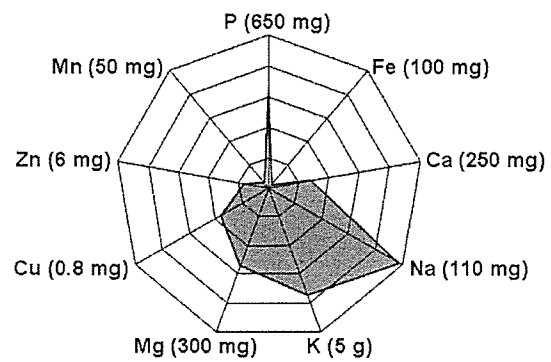


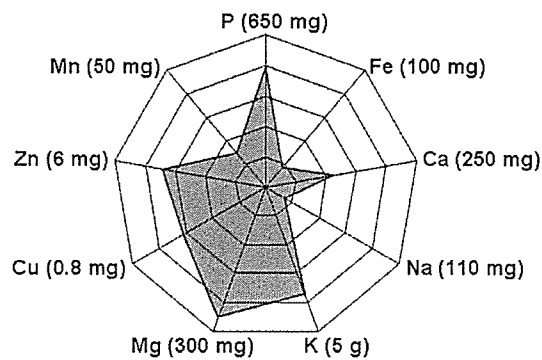
図4-1. 春ウコン中の各ミネラル含有量



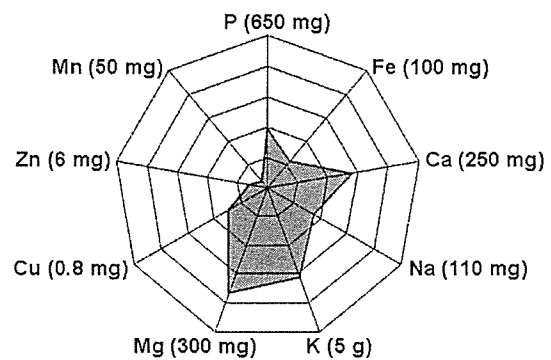
秋ウコン1



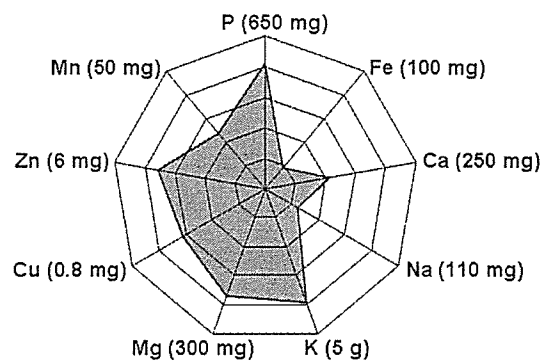
秋ウコン2



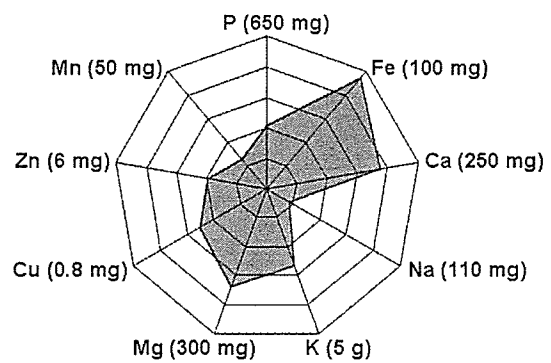
秋ウコン3



秋ウコン4



秋ウコン5



秋ウコン6

図4-2. 秋ウコン中の各ミネラル含有量

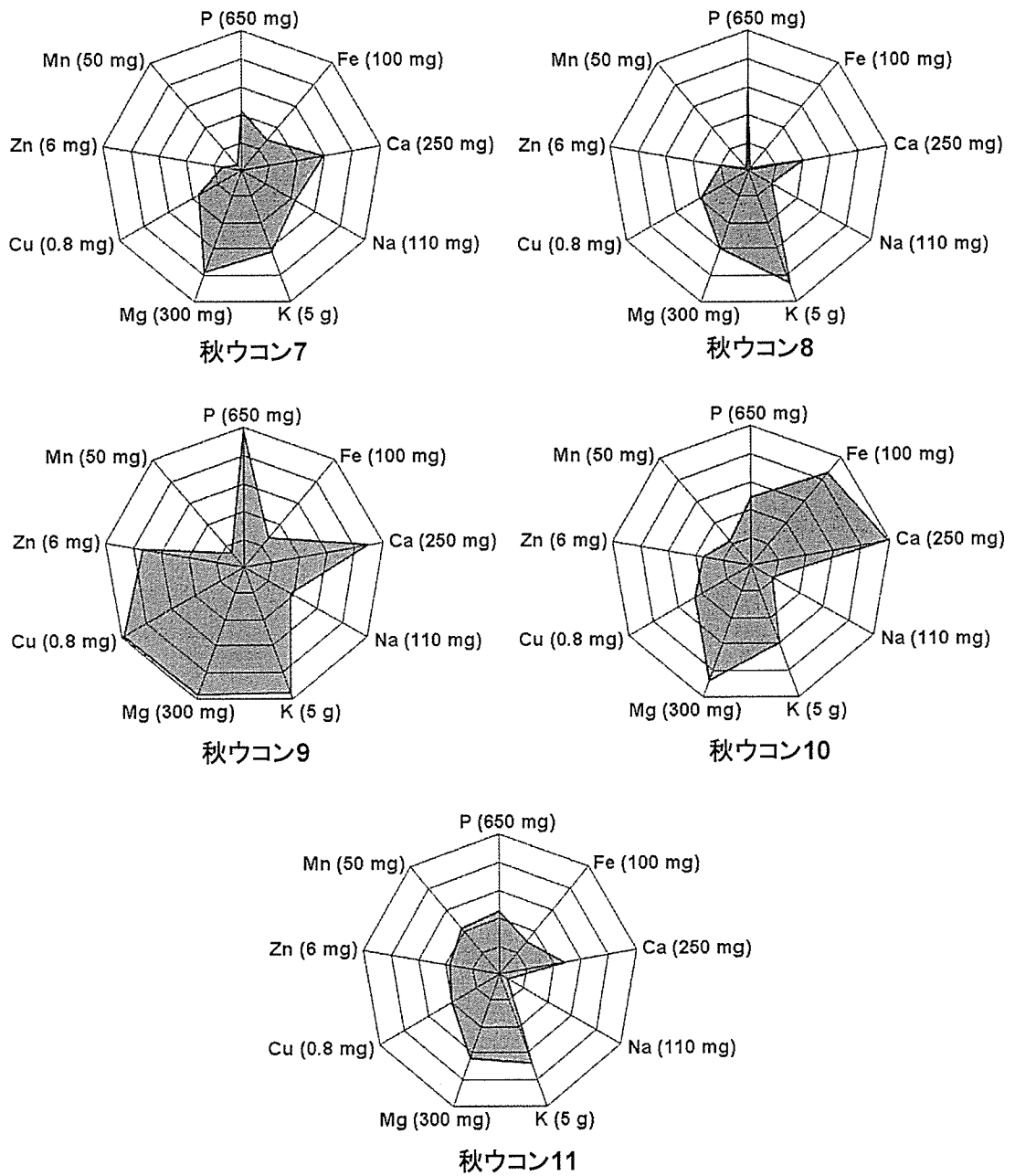


図4-3. 秋ウコン中の各ミネラル含有量

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

特定保健用食品の新たな審査基準に関する研究

分担研究報告書

植物成分を中心とした多成分解析による効性基準の検討

分担研究者 穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究要旨：食品機能成分中で高分子物質のような消化管から吸収困難な健康食品の有効性の機序を解明することを試みた。今年度は機能成分の例としてリンゴプロシアニジン(ACT)の有効性を題材に種々検討した。ACTの食物アレルギー経口投与における感作抑制効果を、ACTをOVAの経口摂取感作誘導 W/W⁰マウス及びB10Aマウスに経口摂取させることにより検討した。血清中OVA特異的抗体価において、ACT摂取群は対照群に比べて血清中OVA特異的IgE及びIgG1抗体価が有意に低かった。また、サイトカイン濃度を測定したところ、培養脾臓細胞による検討では、ACT摂取群は対照群と比べIL-2、IL-12及びIFN- γ 産生が促進され、IL-5及びIL-6産生は抑制された。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。従ってACTは経口感作誘導によるTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比を増加することと関連して、食物抗原経口感作を抑制し、食物アレルギー状態成立への誘導を阻害する可能性が示唆された。またDSS誘発性大腸炎モデル・オキサゾロン誘発大腸炎モデルを用い、ACTの大腸炎発症抑制作用を検討したところ、ACT摂取は両モデルとも大腸炎発症抑制効果を示した。その作用メカニズムとして、IEL・腸管上皮細胞に対する免疫調節作用・抗炎症作用を介して大腸炎予防効果を示すことが示唆された。健康食品として用いられているウコン属植物の成分をLC-MSによる分析で総合的に把握するとともに種間並びに種内での成分の変異の程度を明らかにするために、ウコン(秋ウコン、*Curcuma longa*)、キョウオウ(ハルウコン、*C. aromatica*)、クスリウコン(*C. xanthorrhiza*)、ガジュツ(紫ウコン、*C. zedoaria*) 32系統を同一条件下で栽培し、成分分析用の根茎のサンプルを調製した。また、分析に用いるLC-MSの条件を検討した。

研究協力者：木内文之、飯田修、菱田敦之

((独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター)、吉岡靖雄、松田りえ子、米谷民雄(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

食品成分の中には高重合物質や多糖等の高分子物質のような消化管から吸収困難なもの

でも、有効性が効果を示すものがある。これら食品成分の有効性の機序を評価するには、従来の経口投与後の吸収、分布、排泄等の体内動態や代謝を評価する手法のみでは限界がある。そのため、高重合物質や多糖等の高分子物質のような消化管から吸収困難な健康食品の有効性の機序を解明することを試みる。

またそれらの安全性と有効性を実験動物モデルや培養細胞に評価する手法を開発する共に、開発された評価系を用いて基準審査に関する基礎データを構築する。また関与成分が複数あるとおもわれるウコン、ハルウコン等のウコン属植物について、保存している系統の植物を圃場栽培し、その根茎をサンプルとして収穫・保存することを検討した。ウコン、キョウオウ、クスリウコン、ガジュツの成分のHPLC並びにGC、GC-MSによる分析により、各々の種はクルクミノイド並びにセスキテルペノイドの成分パターンに特徴があることが報告されている¹⁾。また、中国で生薬として用いられている *C. wenyujin*、*C. phaeocaulis*、*C. kwangsiensis*等のセスキテルペン成分並びにDNA塩基配列の比較も報告されている²⁾。更にウコン属植物の遺伝子解析による種の同定法の研究が、富山医薬大の小松らによって行われており、主成分であるクルクミノイドの含量の分析も行われている³⁾。本研究は、クルクミノイドに限らず、LC-MSで分析できる成分を総体として捉え、MSデータを含めた形で参照できるようにして、有効性と成分の関連を評価する基盤とすることを目的とする。

今年度は、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターで保存しているウコン属植物のうち、筑波研究部で保有している系統を同一条件で栽培・収穫し、その形態的特徴を記載す

るとともに、成分分析用のサンプルを調製した。また成分分析に用いるLC-MSの条件について検討した。

B. 研究方法

リンゴプロシアニジンの食物アレルギー感作誘導抑制作用に関する研究

9週齢の雌性 W/W^v マウス及び B10A マウスに OVA 1 mg/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した。9 週間後、脾臓を摘出して細胞懸濁液 (5.0×10^6 cells/ml) を調製し、培養プレートに分注し、*in vitro* において OVA を最終濃度 100 μ g/ml となるよう添加して、培養温度 37°C、CO₂ 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- γ) 濃度を ELISA で定量した。対照群には生理食塩水を添加した。脾臓 T 細胞などの全身免疫系 T 細胞が $\alpha\beta$ T 細胞レセプター (TCR $\alpha\beta$) を発現し、CD4、CD8 分子の発現により 2 つのサブセット (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺、TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺) に分類されるのに対し、腸管上皮内リンパ球 (IEL) は TCR $\alpha\alpha$ 陽性細胞が約半分を占め、CD4、CD8 α 鎖、CD8 β 鎖の発現とあわせて 5 つのサ

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 $\alpha\alpha$ ⁺) 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、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により検討した。さらに経口感作後、5 μ g/ml OVA 200 μ 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。

リンゴプロシアニジンの大腸炎発症抑制効果

1. ACT は蒸留水に溶解し飲料水として経口自由摂取させた。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスは、8 週齢 C57BL6 雄マウスに、2.5% DSS 溶液を 4 日間自由摂取させることにより作成した。ACT の大腸炎発症抑制効果は、1%、0.3%、0.1% ACT を 2 週間経口自由摂取させた後、DSS により大腸炎を誘導し、DSS 投与後の体重変化・生存率により評価した。また大腸組織の組織切片、病理学的スコアにより評価した。

2. オキサゾロン誘発大腸炎モデルマウスは、8 週齢 BALB/c 雌マウスに、40%エタノールに 7.5 mg/mL で溶解したオキサゾロンを 150 μ l 直腸投与することで作製した。また 40%エタノールの影響を検討するため 40%エタノールを直腸投与する群も用意した。その後、オキサゾ

ロン投与開始日から体重変化を測定した。オキサゾロン投与後 3 日目に、大腸から粘膜固有層リンパ球 (LPL) を回収し、LPL を抗 CD3・CD28 抗体存在下で 48 時間培養した後、上清中のサイトカイン量を ELISA で測定した。

3. 6 週齢 C57BL/6J 雄マウスに、1% ACT および水を 2 週間経口自由摂取させた。その後、小腸から腸管上皮間リンパ球 (IEL)、脾臓から脾細胞を回収しフローサイトメトリーにて IEL 及び脾細胞の構成比を測定した。なお IEL は TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ の組成比を、脾細胞は CD4、CD8 の組成比を測定した。さらに IEL を抗 CD3 抗体で 48 時間刺激した後、上清中のサイトカイン産生について解析した。

4. ヒト大腸上皮細胞株 Caco-2 を 24 穴プレートに 2(10⁵ cells/mL で加え、37 度で 48 時間培養した後、300 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と 0.005% ACT を含む培養液中で 37 度・6 時間培養した。培養上清中の IL-8 量は ELISA で測定した。また、細胞から RNA を回収した後、定量的 reverse transcription (RT)-PCR を用い、IL-8 の mRNA 量を測定した。また、細胞核分画を回収した後、ウエスタンブロットティングにより nuclear factor (NF)- κ B 量を測定した。

ウコン属の分析

1. ウコン属植物の栽培：医薬基盤研究所薬用

植物資源研究センター筑波研究部で保存している32系統のウコン属植物を用い、圃場栽培を行った。

植え付け：2005年5月10日

施肥(kg/10アール)：基肥 堆肥 2000 kg、
苦土石灰 100 kg、化成肥料(8-8-8) 50kg；
追肥 7月27日 化成肥料(15-15-15) 26.7 kg；
9月13日 化成肥料(15-15-15) 40 kg

管理：8月3日 圃場敷きわら

収穫：11月22、24、25日(12月1日 試料冷凍 -20℃)

2. LC-MS条件の検討：既に報告されているウコンのクルクミノイド並びにセスキテルペノイド(Fig.9)のLC-MSによる分析法⁴⁾を参考にして、溶媒組成等の条件を検討した。使用した機器は、以下に示す。

HPLC: Agilent 1100 HPLC system (LC Binary Pump、 Thermo Autosampler、 Column Oven、 Diode Array Detector); MS: Applied Biosystems API-3000 LC-MS/MS System (Turbo IonSpray).

3. 分析サンプルの調製：凍結保存したサンプルを解凍後、皮を剥いて磁製おろし金ですりおろしてその2.5 gを50 mlの遠心管に量り取り、HPLC用メタノール20 mlを加えて室温で30分間ソニケーション後、5、000 rpmで15分間遠心し、上清を45 μmのフィルターで濾過してLC-MS分析用サンプルとした。

C. 研究結果

リンゴプロシアニジンの食物アレルギー感作誘導抑制作用に関する検討

W/W^V マウス及び B10A マウスともに 1% ACT 摂取群では非摂取群に比べて血清中 OVA 特異的 IgE、IgG1 抗体価が有意に低下したことから、ACT が OVA 経口感作を抑制することが示された (Fig. 2)。その IgE 抗体産生減少に関しては、ACT 経口摂取の濃度依存性が観察された。また、W/W^V マウスにおいて ASA 誘導後、対照群では急激な体温降下が観察されたが、ACT 投与群はその急激な体温降下が有意に抑制された (Fig. 3)。

B10A マウスにおいても同様に、ACT 投与群は ASA 誘導後の体温降下の有意な抑制が観察されたのに加え、ASA 誘導後の血清中ヒスタミン測定においても、対照群に比べ有意に低値を示した。

脾細胞より産生される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 Th1 型サイトカインである IL-2、IL-12 及び IFN- γ 産生には影響なかったが、Th2 型サイトカインである IL-5 及び IL-6 産生は抑制された。このことから Th2 型の分化が抑制されていることが示唆された。これらの結果より Th1/Th2 バランスにおいて Th2 応答の抑制のため特異的 IgE、IgG1 抗体産生が抑制されたと考えられた。

BALB/c マウスにおいて脾臓 T 細胞などの全

身免疫系 T 細胞では、TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞が主細胞であるが、IEL では TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞が 30-40%を占める。しかし W/W^V マウスにおいては、BALB/c マウスに比べ、IEL では TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞を占める割合が 4-5%であり、また OVA 連日経口投与により感作が進むにつれて IEL の TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比はさらに減少した。しかし ACT 摂取群では OVA 連日経口投与をしたにも関わらず、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。また OVA 非感作 W/W^V マウス、OVA 非感作 BALB/c マウスにおいても、2 週間の ACT 摂取のみで TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比の有意な増加が認められた (Table 1)。以上の結果から、ACT 摂取は TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比を増加誘導する機能を有し、IEL の組成変化を介して OVA の経口感作を抑制する可能性が示唆された。

リンゴプロシアニジンの大腸炎発症抑制効果に関する検討

本検討では、はじめに炎症性腸疾患の研究に広く使用されている DSS 誘発大腸炎モデルマウスを使用した。ACT を投与しないコントロール群 (DSS-control 群) では、DSS 投与後 4 日目から血便・下痢を伴う激しい衰弱を示し、20 日目までに 60%ものマウスが死亡した。一方、1% ACT を 2 週間経口自由摂取させた後、DSS により大腸炎を誘導した群 (1%ACT-DSS 群) では、DSS-control 群と同様に DSS 投与後 4

日目から体重減少を示したが、その減少率は DSS-control 群と比較して有意に低く、20 日目においても全てのマウスが生存しており、顕著な大腸炎発症抑制効果が認められた (Fig. 4)。また大腸組織の顕微鏡的所見においても、DSS-control 群では、粘膜固有層及び筋層への著しい炎症細胞の浸潤と腸管陰窩の消失を伴う明らかな炎症像が観察されるのに対し、1%ACT-DSS 群では炎症所見並びに固有構造の消失が軽度であった (Fig. 5)。また、これら炎症細胞の浸潤、上皮細胞の傷害度をスコア化した結果、1%ACT-DSS 群では DSS-control 群と比較してその重篤度は減少していた。次に、大腸炎発症抑制効果における ACT の濃度依存性を検討した結果、0.1% ACT 投与群では体重減少・生存率ともに DSS-control 群と比べて有効性は認められないものの、0.3% ACT 投与群では 1% ACT 投与群とほぼ同等の予防効果を示した。また、ACT の投与期間における大腸炎発症抑制効果に関して検討した結果、1% ACT を 7 日、3 日間投与した群では、DSS-control 群と比較して、体重減少、生存率共に、大腸炎発症抑制効果を示すものの、14 日間投与と比較すると、その効果は減弱しており、ACT の効果はその投与期間に依存することが明らかとなった。

次に、ACT の有効性をオキサゾロン誘発大腸炎モデルマウスを用い検証した。オキサゾ

ロン誘発大腸炎モデルマウスは、大腸の粘膜固有層リンパ球 (LPL) の過剰な Th2 型サイトカイン産生により大腸炎が誘発されると考えられており、ヒトの潰瘍性大腸炎と類似した病態をとるモデルマウスである。ACT を投与せずオキサゾロンにより大腸炎を誘発したコントロール群 (oxazolone-control 群) では、オキサゾロン投与後 1 日目に顕著な体重減少を示し、2 日目以降も体重減少を示した。一方、1% ACT を 1 週間経口自由摂取させた後、大腸炎を誘発した群 (1%ACT-oxazolone 群) では、oxazolone-control 群と同様に 1 日目に体重減少を示したが、2 日目以降から体重は増加し、3 日目には oxazolone-control 群と比較して有意な体重増加が認められた。次にオキサゾロン投与 3 日目に大腸 LPL を回収し、抗 CD3・CD28 抗体で刺激後のサイトカイン産生を解析した。その結果、oxazolone-control 群では 40%エタノール投与群と比較して、IL-4、IL13 などの Th2 型サイトカイン産生が有意に上昇したが、1%ACT-oxazolone 群では oxazolone-control 群と比較して IL-4、IL13 の産生は減少した。一方で、Th1 型サイトカインである IFN- γ においても、oxazolone-control 群では 40%エタノール投与群よりも高い産生量を示したが、oxazolone-control 群と 1%ACT-oxazolone 群では変化がなかった。以上より、ACT はオキサゾロン投与に伴う LPL からの Th2 型サイトカイン

産生を抑制することで、オキサゾロン誘発大腸炎に対し、予防的に作用することが示唆された。

次に、ACT の腸管免疫系に及ぼす影響を検討した。ACT が高分子量のため吸収が困難であると思われることから、腸管免疫系の中でも腸管上皮内に存在する IEL に焦点を絞り検討した。1% ACT を 2 週間経口自由摂取させた後、IEL、脾臓を回収し、FACS を用い細胞組成比変化を検討した。その結果、脾臓では 1% ACT 投与群と対照群で CD4-T 細胞、CD8 α -T 細胞において組成比変化は認められなかった。一方、IEL においては、1% ACT 投与群において TCR $\gamma\delta$ -T 細胞組成比の増加、TCR $\alpha\beta$ -T 細胞組成比の減少が認められた。次に ACT 摂取による IEL の組成比変化が、IEL の機能にどのように影響するか、IEL より産生されるサイトカインを指標に検討した。IEL を回収後、抗 CD3 抗体で刺激し、上清中のサイトカイン量を ELISA で測定した。その結果、ACT 投与群では炎症性サイトカインである IFN- γ の有意な減少が認められた。抑制性サイトカイン TGF- β の産生は ACT 投与群、対照群で変化はなかった (Fig. 6)。以上より、ACT は IEL の細胞組成比を変化させることで、IFN- γ 産生を抑制することが明らかとなった。

次に ACT の腸管上皮細胞に対する作用を検討した。腸管上皮細胞は正常時は腸内細菌な

どの進入を防御すると共に、腸内細菌・異物に対して不応答な状態にある。しかし、傷害・刺激を受けると、物理的バリアーの破壊により腸内細菌・異物が生体内に侵入しマクロファージの活性化を誘導する。同時に、自らも IL-8 などの走化性因子を放出し、好中球を誘導し、異物除去へと向かう。しかし、これらの過剰・持続的な活性化は、自らの組織破壊へと繋がり、炎症性腸疾患などを引き起こすと考えられている。本検討ではヒト大腸上皮細胞株 Caco-2 を用い、PMA 刺激による IL-8 産生に対する ACT の作用を検討した。

Caco-2細胞をPMAで6時間刺激したところ、無刺激群と比較して顕著なIL-8産生が認められた。ACT存在下でPMA刺激した場合、PMA刺激によるIL-8産生はACT濃度依存的に有意に抑制された。なお、ACT単独では、IL-8産生は認められなかった (Fig. 7 A))。次に、このIL-8産生抑制がIL-8の転写レベルで抑制されているのか検討した。細胞よりRNAを回収し、逆転写反応の後、定量的PCRを用いてIL-8を測定した。その結果、ACT存在下でPMA刺激した場合、PMA刺激によるIL-8転写は有意に抑制されており、mRNAレベルでIL-8は抑制されていることが明らかとなった。PMA刺激によるIL-8の転写は、PMAによるNF-(Bの細胞質から核への移行を伴う活性化により誘導される。そこで、ACTがNF-(Bの核移行を抑制するかウ

エステンブロットティングにより検討した。

Caco-2をPMAで2時間刺激した後、核画分を回収し抗NF-(B抗体を用いウエステンブロットティングした。その結果、PMA刺激によりNF-(Bの顕著な核移行が観察された。一方、ACT存在下でPMA刺激した場合、NF-(Bの核移行が顕著に抑制されることが明らかとなった (Fig. 7 B))。

ウコン属の分析

植物体の栽培：保存していた根茎を5月に圃場に植え付け、11月下旬に収穫して成分分析に用いる根茎を冷凍保存した。実験用に栽培したウコン属植物の地上部の特徴を表1に示す。また、ウコンとガジュツ各2系統の写真を図2、3に示す。本年は夏季が高温で植物体の生育が極めて旺盛であり、条件のそろった根茎が得られた。

LC-MS条件の検討：既に報告されているLC-MSによるウコンの成分の分析条件を基に、Waters Symmetry C₁₈ カラム (15 cm x 2.1 mm) を用い、0.25%酢酸-アセトニトリルを溶媒としてグラジエントの条件を変え、成分の分離状況を検討した。ウコン属植物の成分分析に適すると思われる分析条件によるウコンの成分の分離の様子を図4に示す。

D. 考察

IELにおけるTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞は他のリンパ節とは違い主要な細胞集団である。Keらは抗TCR $\gamma\delta$ レセプター抗体の投与及びTCR δ 鎖ノッ

クアウトマウスで経口免疫寛容の誘導阻害がみられることを示した。また Mengel らは経口免疫寛容を誘導したマウスの TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞を同系のマウスに移入すると経口免疫寛容を誘導可能であることを示している。これらのことは IEL の TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞は経口免疫寛容の誘導に重要な役割を担っていることを示唆している。以上の知見を考え合わせると、ACT 摂取は IEL の TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞を増加誘導する機能を有し、その機能と関連して腸管免疫系から全身免疫系を介する食物タンパク質の経口感作誘導成立を抑制する効果を示すことが示唆された。

大腸炎予防効果の検討では、ACT は PMA 刺激による NF- κ B の核移行に伴う活性化を抑制することで IL-8 の転写・産生を抑制することが示唆された。この NF- κ B 活性化抑制は、ACT の大腸炎発症予防効果に寄与するものと考えられた。

ウコン属の分析の検討では、分析に用いるウコン属植物を栽培し、条件のそろったサンプルを確保した。これらは、種間の成分パターンの比較並びに同一種の系統間の成分変動を把握するのに重要な役割を果たす。しかし、同一種内での成分の変動の程度を把握するためには、多くの系統について調査するとともに、同一系統についても、栽培条件の差による影響等を把握する必要がある。これについ

ては、次年度に種子島研究部に於いて栽培を行い、サンプルを確保する予定である。LC-MS による成分の分析条件に関しては、文献記載の方法を改良することにより、比較的良い分離条件が得られた。しかし、この条件では 3 種のクルクミノイドは容易に分離するが、これらとほぼ同じ保持時間で溶出するセスキテルペノイドが存在する。両者は UV 吸収波長並びに質量数で容易に区別できるため、データの処理に際しての工夫で対応できるものと考えられるが、更に分析条件を検討し、十分な分離が得られるよう検討する。

E. 結論

本研究では、ACT は経口感作誘導による TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比を増加することと関連して、食物抗原経口感作を抑制し、食物アレルギー状態成立への誘導を阻害する可能性が示唆された。また DSS 誘発性大腸炎モデル・オキサゾン誘発大腸炎モデルを用い、ACT の大腸炎発症抑制効果を検討した。また、その作用メカニズムとして、IEL・腸管上皮細胞に対する免疫調節作用・抗炎症作用を介して大腸炎予防効果を示すことが示唆された。これらの結果は、ACT のような消化器系から吸収が困難な物質にも、腸管粘膜免疫系を介しての全身作用に影響することを示唆する知見であり、機能性メカニズムの解明が困難であった高分子物質に機能メカニズム解明に関する検討で、動物

実験ではあるが、腸管免疫系から全身免疫系への情報伝達に関わる知見が得られたと考えられる。

また健康食品として用いられているウコン属植物の成分を総体的に把握して、安全性・有効性を評価する基盤を作るための基礎データを収集する材料として、ウコン属植物 32 系統を栽培し、条件のそろった根茎材料を確保した。また、成分の LC-MS による分析の条件についても検討し、適当と思われる条件を設定した。次年度は、分析対象とするウコン属植物材料の確保を更に行うとともに、今年度確保した材料についての成分分析を行い、そのデータの利用法を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表：

1. Yoshioka Y, Akiyama H, Nakano M, Shouji T, Kanda T, Ohtake Y, Takita T, Matsuda R, Maitani T. Orally administered apple procyanidins protect against experimental inflammatory bowel disease in mice. Submitted
2. Rat tracheal epithelial responses to water avoidance stress. Akiyama H, Amano H, Bienenstock J, *J Allergy Clin Immunol.*, 116, 318-324 (2005)
- Apple Procyanidin Oligomers Absorption in Rats After Oral Administration: Analysis of Procyanidins in Plasma Using the Porter Method and

HPLC/MS/MS. Toshihiko SHOJI, Saeko MASUMOTO, Nina MORIICHI, Hiroshi AKIYAMA, Tomomasa KANDA, Yasuyuki OHTAKE, Yukihiro GODA, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 884-892 (2006).

Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergy in murine model. Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Takahiro Watanabe, Megumi H. Nagaoka, Yasuo Yoshioka, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Kiyoshi Yamada, Mamoru Totsuka, Reiko Teshima, Yukihiro Goda, Jun-ichi Sawada, Tamio Maitani *FEBS lett.*, 579, 4485-4491 (2005).

Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W^v mice. Teshima, R., Okunuki, H., Sato, Y., Akiyama, H., Maitani, T., Sawada J., *Allergology International*, 55, 43-48 (2006).

Orally administered apple condensed tannin protect against experimental inflammatory bowel disease, Yasuo Yoshioka¹, Hiroshi Akiyama, Masataka Nakano¹, Toshihiko Shouji, Tomomasa Kanda, Toshichika Takita, Rieko Matsuda, Tamio Maitani, *Gut*, submitted

Chondroitin sulfate intake inhibits the IgE-mediated allergic response by down-regulating Th2 responses in mice. Shinobu Sakai, Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Yasuo Yoshioka, Robert J. Lin-

hardt、Yukihiro Goda、Tamio Maitani、Toshihiko Toida、*J. Biol. Chem.*、submitted

2. 学会発表:

1. 穂山浩、佐藤雄嗣、渡邊敬浩、長岡(浜野)恵、吉岡靖雄、庄司俊彦、神田智正、山田潔、戸塚護、手島玲子、合田幸広、澤田純一、米谷民雄; リンゴ未熟果由来プロシアニジンの食物アレルギー感作誘導抑制作用に関する研究; 第15回天然薬物の開発と応用シンポジウム、東京、2005年11月

2. Hiroshi Akiyama, Yuji Sato, Takahiro Watanabe, Megumi H. Nagaoka, Yasuo Yoshioka, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Kiyoshi Yamada, Mamoru Totsuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Yukihiro Goda, Tamio Maitani; Apple condensed tannin inhibits the development of food allergies in mouse models; 日本免疫学会学術講演会、横浜、2005年12月

3. 吉岡靖雄、穂山浩、庄司俊彦、滝田聖親、神田智正、松田りえ子、米谷民雄; プロシアニジンによる大腸炎発症予防効果とその作用メカニズムに関する検討; 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、2005年10月

4. 中野真孝、吉岡靖雄、穂山浩、庄司俊彦、神田智正、松田りえ子、滝田聖親、米谷民雄; リンゴ由来プロシアニジンによる大腸炎発症予防効果に関する検討; 第49回日本薬学

会関東支部、東京、2005年10月

G. 知的財産権の出願・登録: なし

H. 参考文献

1) 松尾健 他、健康食品中の*Curcuma*属の成分組成と種の推定、広島県保健環境センター研究報告、**10**、7-13 (2002).

2) Quan Xia *et al*、Molecular Genetic and Chemical Assesment of Rhizoma Curcumae in China、*Agric. Food Chem.*、**53**、6019-6026 (2005).

3) Yohei Sasaki *et al*、Sequence Analysis of Chinese and Japanese *Curcuma* Drugs on the 18S rRNA Gene and *trnK* Gene and the Application of Amplification- Refractory Mutation System Analysis for Their Authentication、*Biol. Pharm. Bull.*、**25**、1593-1599 (2002); Hui Cao *et al*、Molecular Analysis of Medicinally-Used Chinese and Japanese *Curcuma* Based on 18S rRNA Gene and *trnK* Gene Sequence、*Biol. Pharm. Bull.*、**24**、1389-1394 (2001).

4) Xian-Guo He *et al*、Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*)、*J. Chromatography A*、**818**、127-132 (1998).