

Rats were given bilobalide (30 mg/kg). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SE for 4 rats.  
 \* : P<0.05 \*\* : P<0.01 \*\*\* : P<0.0001 Significant *versus* 0 hr.

図7 ビロバライド投与時のラット肝臓CYP mRNA 発現量の経時変化

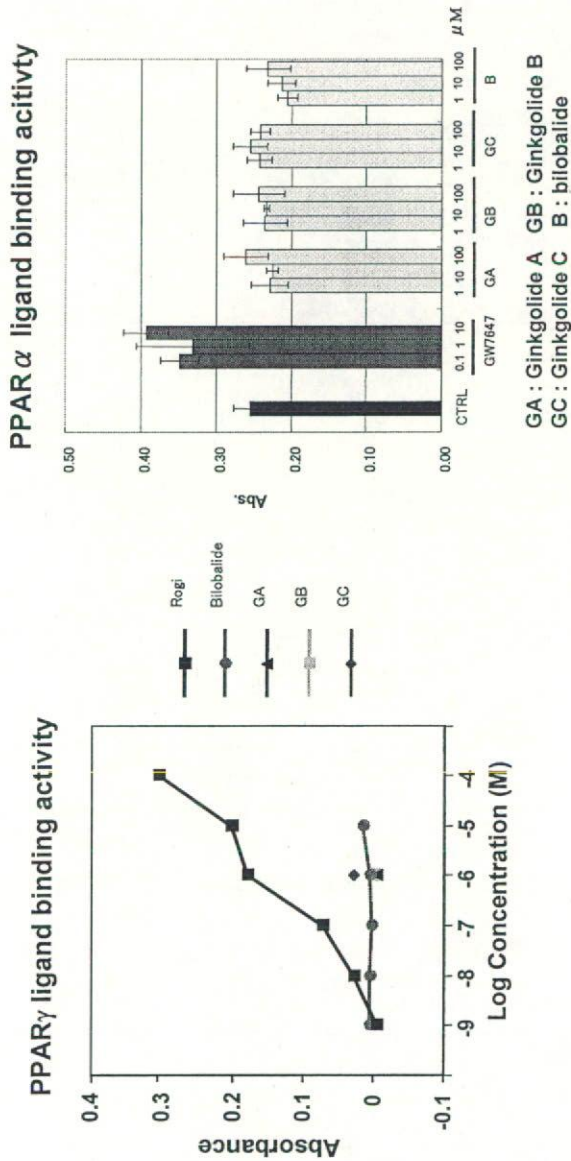


図7 テルペノイド類の PPAR $\gamma$  ならびに PPAR $\alpha$  のリガンド活性  
 CoA-BAP 法で測定。PPAR $\gamma$  は、ロシグリタゾン (ポジティブコントロール) 10-8M まで、ピロバライ  
 ドは 10-9M~10-5M まで、ギンゴライドは、10-6M でのみでそれぞれ評価した。PPAR $\alpha$  は GW7647 (ジテ  
 イブコントロール)、ピロバライド、ギンコライド、ギンコライド A、B、C をそれぞれ 1, 10, 100 $\mu$ M で評価した。

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有効性基準の検討

分担研究者 亀山 浩, 近藤一成

(国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部)

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が困難で、作用機序が明確でない化合物の健康食品としての有効性を評価するのに必要なパラメーターを明らかにすることを試みた。平成17年度において、リンゴプロシアニジン(ACT)の有効性評価を検討した。ACTのオバルミン(OVA)経口摂取感作誘導W/W<sup>v</sup>マウス及びB10Aマウスへの経口摂取により、ACT摂取群では、血清中OVA特異的IgE及びIgG1抗体価の有意な低下、Th1型サイトカインIL-2、IL-12及びIFN- $\gamma$ の産生促進、Th2型サイトカインIL-5及びIL-6の産生抑制が観察された。腸管上皮内リンパ球(IEL)サブセット解析では、ACT摂取群はTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比の有意な増加が認められ、ACTは、経口感作誘導によるTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比の増加を介して食物抗原経口感作を抑制することが示唆された。平成18年度においては、コンドロイチン硫酸(CS)の有効性評価を検討した。2%CS任意摂取によりOVA特異的IgE及びIgG1抗体価を有意に抑制した。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惹起実験で、CSは肥満細胞からの血清中ヒスタミン遊離および抗原誘発耳介浮腫を有意に抑制した。また、Th2型サイトカインIL-5、IL-10及びIL-13産生を有意に抑制された。平成19年度は、リンゴおよびブドウプロアントシアニジンの有効性評価のために*in vitro*で種々検討した。重合度の違いにより分画したプロアントシアニジンについて、肥満細胞からの脱顆粒、ヒスタミン遊離抑制効果を検討したところ、平均分子量3,000以上の高分子画分に活性が認められた。さらに高分子画分では脱顆粒抑制効果に違いはなく、一定の分子の大きさが必要と考えられた。細胞内シグナルの検討から、Syk, PLC, MAPKの各キナーゼリン酸化には影響せず、抗原刺激で誘導される脱顆粒時に起きるアクチン再構成を阻害することが分かった。また、中国産プロポリスには抗アレルギー成分が含まれることが示唆された。さらに、ウコンのラットに対する急性経口毒性試験、14日間反復経口投与毒性試験を行った結果、毒性学的意義のある変化は認められなかった。

研究協力者:

手島玲子, 松田りえ子, 米谷民雄, 吉岡靖雄、  
(国立医薬品食品衛生研究所),  
菱田敦之, 木内文之, 飯田 修 ((独)医薬基盤  
研究所薬用植物資源研究センター),  
薮島淳子, 首藤康文 (財団法人残留農薬  
研究所神経毒性研究室)

A. 研究目的

食品成分の中には高重合物質や多糖類など、消化管から吸収困難なものでも、有効性が示唆されるものがある。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、高重合物質や多糖類などの高分子物質のような消化管からの吸収が困難な健康食品の、有効性の機序を解

明することを試みる。そして、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、生薬・薬用植物についてバイオマーカーを指標とした科学的評価法の開発と安全性の検証を行うことを目的とする。前年度に引き続き、国内で消費量の多い薬用植物ウコンおよびウコン属植物をラットに投与し、臨床および解剖学的検査に基づいて投与の影響を検証する。投与によって血液中に特異的に発現するタンパク質、ペプチドからバイオマーカーの候補を検索する。

## 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<sup>V</sup> 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 ( $5.0 \times 10^6$  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  $\mu$ g/ml 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。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 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、TCR $\alpha\beta$ <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 $\alpha\alpha$  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、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  $\mu$ 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。

### リンゴプロシアニジンの大腸炎発症抑制効果

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 C57BL/6 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。

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 (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。

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 $\alpha\alpha$ 、TCR $\alpha\beta$  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。

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、ウエスタンブロッティングにより nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 量を測定した。

#### プロアントシアニジンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

本年度は、ブドウ由来プロアントシアニジンを用いて、*in vitro* でその作用機序について検討した。プロポリスについては、中国産とブラジル産について抗アレルギー作用について検討した。

#### 実験材料

本実験では、*in vitro* 抗アレルギー作用の検討には、ラット好塩基球細胞 (RBL-2H3) およびヒト IgE 受容体を導入した RBL-SX38 細胞を用いた。

ブドウ種子由来プロアントシアニジンは、重合度の違いにより高分子画分 (GSP-H) と低分子画分 (GSP-L) に分離した。平均重合度は、NMR 測定からそれぞれ 10 と 3 であると推定された。

ブラジル産・中国産プロポリスの水抽出物、エタノール抽出物を用いて  $\beta$ -hexosaminidase release assay (脱顆粒) による抗アレルギー活性評価を行ったところ、エタノール抽出物が低濃度で抑制効果が見られたため、以後このエタノール抽出物を用いた。エタノール抽出物は、脱顆粒抑制効果を指標に、順相、逆相カラムクロマトグラフィーによる分画精製した。すなわち、2g/10mL となるようクロロホルムに再溶解し、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-820MH (富士シリシア) 100g を用い、溶出溶媒はクロロホルム・メタノール混液を 100:0 1L, 98:2 1L, 90:10 5L, 0:100 3L と組成を変

えて行った。その後、Chromatorex ODS DM1020T (富士シリシア) 100g を用い、溶出溶媒は水・メタノール混液を 50:50 0.5L, 30:70 1L, 0:100 1L と組成を変えて分画精製を行った。

#### 脱顆粒測定

感作および抗原刺激には、DNP 特異的マウス IgE 抗体と DNP-HSA (ヒトアルブミン) あるいは Nitrophenylacetyl (NP) 特異的ヒト IgE と NP-BSA (ウシアルブミン) を用いた。脱顆粒の測定には、ヒスタミン測定 (Histamine EIA kit) および  $\beta$ -hexosaminidase 活性を指標に行った。

$\beta$ -hexosaminidase 活性は 405 nm の吸光度を測定した。プロポリス試料は、それ自身の強い黄色のため正確に測定できなかった。そこで、基質に methylumbelliferyl 基の付いたものを用いた改良法、355 nm 励起、460 nm 蛍光測定で行った。

#### 細胞骨格の染色

8-well 培養チャンバー中に培養し、プロアントシアニジン処理した細胞を PBS で洗浄した後、ホルマリン固定、Triton X-100 処理した。その後、アクチンの染色には Texas-Red 標識 phalloidin を、チューブリン染色には、anti-tubulin 抗体を Texas-Red あるいは FITC 標識して用いた。

#### 耳介肥厚測定法

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た。

塩化ピクリルが 1% となるようにアセトンに溶解したものを用いた。DNP-OVA による 2 次免疫応答後、血清中 IgE 抗体濃度の上昇を確認した後、塩化ピクリル塗布による抗原刺激を行った。測定は、耳の薄い部分の方が誤差が少ないこと、及び弾力性があるため測定中に目盛が徐々に低値を示すことから、耳の薄い部位に対して測定時間を 2 秒と一定して、耳介浮腫容積測定装置 (Dial Thickness Gauge, Peacock) で測定した。塩化ピクリ

ル 10  $\mu$ L/匹をマウスの左耳の表裏に塗布した1時間後の左耳の肥厚を測定し、感作前の厚さとの差を腫脹とした。

#### 血清中ヒスタミンの HPLC 分析

血清中遊離ヒスタミンの分析は蛍光ポストカラム検出法を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより行った。試料の分離は Shim-pack PAG-SP 及び Shim-pack ISC-05 カラムを用い、流速 0.6 mL/min, カラム温度 50°C で行った。カラムスイッチング分析のため、溶媒は A, 100 mM EDTA $\cdot$ 2Na (pH 6.0) containing 10 mM SDS; B, 100 mM EDTA $\cdot$ 2Na (pH 8.5) containing 1 M NaCl<sub>4</sub>; C, 3.7 mM OPA dissolved in 6.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> containing 5% CH<sub>3</sub>CN (pH 2.8); D, 100 mM EDTA $\cdot$ 2Na (pH 8.5) を用い、プレカラム: 4.0 分, A $\rightarrow$ D; 9.0 分, D $\rightarrow$ A 及びトラップカラム: 3.3 分, B $\rightarrow$ A; 7.0 分, D $\rightarrow$ B のタイムプログラムで 2 段カラムスイッチングを行い、初期条件で 20 分間平衡化した。ポストカラム試薬である OPA は 0.3 mL/min の一定流速で送液した。反応後は励起波長 360 nm, 蛍光波長 440 nm で蛍光検出した。

#### ウェスタンブロッティング

10-cm 培養ディッシュ中でプロアントシアニジン処理した細胞を PBS で洗浄した後、Lysis バッファー (1% Triton X-100, 20 mM Tris, 1mM EDTA, 137 mM NaCl, protease inhibitors, phosphatase inhibitors) で可溶化し、遠心後上清を各種抗体 (Syk, PLC, MAPK) を用いてウェスタンブロッティングを行った。

#### コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

##### 実験動物

本実験は全て雌性 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°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た。

#### 免疫及び計画

OVA 20  $\mu$ g 及び ALUM 2 mg, もしくは DNP-OVA 10  $\mu$ g 及び ALUM 4 mg を 400  $\mu$ L の生理食塩水に溶解し、マウスに腹腔投与 (1 次免疫) し、10 日後に同量の投与 (2 次免疫) を施し、17 日後に採血した翌日に脾臓及び腸管を摘出した。

CS 経口投与は、1 次抗原感作から 400 mg/kg/day で行った群と、抗原 1 次感作の 1 週間前から、給水瓶中に 2% CS を入れてマウスに任意に摂取させた群を評価した。

#### 抗原特異的抗体価測定法

Radioallergosorbent (RAST) 法の原理に基づく EIA を応用して行った。抗原 (OVA 及び DNP-OVA) を 0.05 M carbonate-bicarbonate で希釈し、96 well マイクロプレートに 50  $\mu$ L/well 加え、4°C で一晩静置して、抗原を固相化した。固相化の後に well 内を洗浄し、夾雑物をブロッキングするために 0.1% Casein-PBS を 200  $\mu$ L/well 加え室温で 1 時間静置した。ブロッキングの後に well 内を洗浄し、0.1% Casein-PBS で希釈した血清試料を 50  $\mu$ L/well 加え、4°C で 1 日静置して、固相化抗原と血清中抗体 (1 次抗体) を抗原抗体反応させた。抗原 (1 次) 抗体反応の後に well 内を洗浄し、ウサギ抗マウス抗体 (2 次抗体) を 50  $\mu$ L/well 加え、室温下 1 時間抗原抗体反応させた。抗原 (2 次) 抗体反応の後に well 内を洗浄し、 $\beta$ -Gal-GAR IgG (3 次抗体) を 50  $\mu$ L/well 加え、室温下抗原抗体反応させた。抗原 (3 次) 抗体反応の後に well 内を洗浄し、酵素反応の基質として 0.1 mM 4-MUG を 100  $\mu$ L/well 加え、37°C で 1 時間反応させた。酵素反応の後に 1 M 炭酸ナトリウム 25  $\mu$ L/well 加え反応を停止させ、反応産物 4-methyl-umbelliferone の蛍光強度を励起波長 330 nm, 蛍光波長 453 nm の吸収波長を蛍光プレートリーダーで測定した。各検体の抗体価は、コントロール群の血清中抗体の示した蛍光強度の 1/2 倍の値を示す希釈度 (力価) で表した。

#### 血清中ヒスタミンの HPLC 分析

血清中遊離ヒスタミンの分析は蛍光ポストカラム検出法を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより行

った。試料の分離は Shim-pack PAG-SP 及び Shim-pack ISC-05 カラムを用い、流速 0.6 mL/min, カラム温度 50°Cで行った。カラムスイッチング分析のため、溶媒は A, 100 mM EDTA・2Na (pH 6.0) containing 10 mM SDS; B, 100 mM EDTA・2Na (pH 8.5) containing 1 M NaCl; C, 3.7 mM OPA dissolved in 6.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> containing 5% CH<sub>3</sub>CN (pH 2.8); D, 100 mM EDTA・2Na (pH 8.5)を用い、プレカラム: 4.0分, A→D; 9.0分, D→A 及びトラップカラム: 3.3分, B→A; 7.0分, D→B のタイムプログラムで2段カラムスイッチングを行い、初期条件で20分間平衡化した。ポストカラム試薬である OPA は 0.3 mL/min の一定流速で送液した。反応後は励起波長 360 nm, 蛍光波長 440 nm で蛍光検出した。

#### サイトカイン産生の測定法

測定は, PharMingen 社の OptEIA™ Set を用いて行った。抗マウス各種サイトカインモノクローナル抗体を固相化緩衝液(0.1 M carbonate, pH 9.5 もしくは 0.2 M sodium phosphate, pH 6.5)で至適濃度に希釈し, 96 well マイクロプレートに 100 µL/well 加え, 4°C で一晩静置して1次抗体を固相化した。固相化の後に well 内を洗浄し, 共雑物をブロッキングするために 10% FCS 含有 PBS を 200 µL/well 加え, 室温下 1 時間静置した。ブロッキングの後に well 内を洗浄し, 脾細胞培養上清を 100 µL/well 加え, 室温下 2 時間静置して, 1 次抗体と上清中サイトカインを抗原抗体反応させた。抗原(1次)抗体反応の後に well 内を洗浄し, ビオチン標識抗マウス各種サイトカインモノクローナル抗体及びアビジン標識 HRP を 10% FCS 含有 PBS で至適濃度に希釈し, 100 µL/well 加え, 室温下 1 時間静置して 1 次抗体と結合したサイトカインと 2 次抗体を抗原抗体反応させた。抗原(2次)抗体反応の後に well 内を洗浄し, 酵素反応の基質として, TMB 及び過酸化水素混合液を 100 µL/well 加え, 暗中室温下 30 分間反応させた。酵素反応の後に 1 M リン酸 50 µL/well 加え反応を停止させ, 450 nm の吸光波長を紫外可視マイクロプレートリーダー(E max, Molecular Devices 社)を用い, エンドポイントで測定した。サイトカイン量は濃度既知標準品を用いて検量線を作成して定量した。

#### フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析

2 x 10<sup>5</sup> cells/(100 µL PBS)の脾細胞を FACS チューブ(FALCON, 2054)に移し, チューブ内で 250 ng の抗マウス CD16/32(Fcγ III/II receptor, FcBlock™)と 4°C, 遮光下 5 分間抗原抗体反応させた。Fc 受容体をブロックした脾細胞を PBS で洗浄した後, 蛍光標識抗体(FITC, fluorescein isothiocyanate 標識抗体 250 ng, PE, phycoerythrin 標識抗体 100 ng, PerCP, peridinin chlorophyll protein 標識抗体 200 ng)をチューブ内に添加し 4°C, 遮光下 40 分間染色した。PBS で 2 回洗浄した後, 500 µL の 2% FBS 含有 PBS に懸濁させ, FACS Calibur™(Becton Dickinson 社)で測定した。得られたデータは Cell Quest ソフトにより解析した。

#### バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

#### 実験材料

(独)医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター種子島研究部で栽培したウコン *Curcuma longa* L. (種子島在来, 0092-634) を 2006 年 3 月に収穫し, 実験試料とした。ウコンの根茎をオートクレーブ(100°C, 無加圧)で 20 分間蒸し, 陰干し, 通風乾燥機(50°C)で 3 日間乾燥後, ワイヤブラシで表面を磨き, 粉碎器で微粉末にし, 投与試料(被験物質)とした。投与試料は, 被験物質をコーンオイルに懸濁させて投与試料を調製した。投与試料の濃度は, 1000mg/kg 用量が 100mg/mL, 2500mg/kg 用量は 250mg/mL とした。

#### ラットを用いた投与試験A

動物実験は, 急性経口毒性試験に準拠し, 財団法人残留農薬研究所で実施した。試験は, 農林水産省(59農蚕第4200号, 1985年)の試験指針に基づいて実施した。Wistar Hannover系 SPF ラット(BrlHan: WIST@Jcl(GALAS))を用い, 実験中の飼育管理は, 室温 22 ± 3°C, 湿度 50 ± 20%, 換気回数 10 回以上/時間, 照明時間 12 時間/日に制御された。

動物飼育室で行った。投与には、ウコンの粉末を250 mg/mLになるようにコーンオイルと混合したものを、1回につき10 mL/kgを胃ゾンデを用いて経口投与し、30分間隔で2回投与して合計5,000 mg/kgの単回投与とした。対照群には、同様にコーンオイルのみを2回投与した。各群は、剖検に5頭、採血用に5頭の合計10頭で試験した。投与日から14日間、動物の状態、行動および死亡の有無を観察し、急性毒性の有無を判断した。14日目の観察終了後、ラットをエーテル麻酔下で安楽死させ剖検に供した。

#### ラットを用いた投与試験B

動物実験は、14日間反復経口毒性試験に準拠し、財団法人残留農薬研究所で実施した。試験は、農林水産省(59農蚕第4200号, 1985年)の試験指針に基づいて実施した。Wistar Hannover系SPFラット(BrlHan: WIST@Jcl(GALAS))を用い、実験中の飼育管理は、室温 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数10回以上/時間、照明時間12時間/日に制御された動物飼育室で行った。

被験物質の投与方法は強制経口投与とし、14日間にわたって反復経口投与した。投与用量は、体重1 kg当たり10 mLとした。対照群の動物には溶媒のみを同様に投与した。なお、本被験物質の特性から、1回に投与可能な最高用量は2,500 mg/kgであったことから、5,000 mg/kg投与群では被験物質濃度2,500 mg/kgを30分間隔で2回投与して、5,000 mg/kgの用量とした。5,000 mg/kgに対する対照群では同様に溶媒のみを2回投与した。

#### 採血と血漿画分の調製

エーテルの深麻酔下で開腹し、後大静脈よりヘパリンナトリウム注射液(1000単位/mL)で内壁をぬらした(ヘパリンナトリウム注射液100  $\mu\text{L}$ に対して血液が1.5~5 mLになるように処理)注射筒を用いて採血した。採取血液を分離剤入り試験管に移し攪拌後、遠心分離(3000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 10分)し、上清を血漿画分とした。

#### 分析試料の調製

各群についてラット3個体の血漿画分を等量混合し、Qproteome Murine Albumin Depletion Kit (QIAGEN)を用いてアルブミンを除去してアルブミン除去血漿画分とし、これに4倍量の冷アセトンを加え、氷上で15分間放置後、遠心分離(12,000  $\times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10分)して沈殿物を回収した。

沈殿物は、0.1% SDSおよび2 mM DTTを含むトリリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、 $60^\circ\text{C}$ で1時間加熱後、試料のタンパク質量とトリプシン量の比が100:1~20:1(w/w)になるようにトリプシン溶液を加え、 $37^\circ\text{C}$ で15時間反応させた。反応終了後、遠心エバポレーターで濃縮し、0.1%ギ酸を含む50% (v/v)アセトニトリルに溶解して分析試料とした。なお、トリプシン溶液は、12.5 ng/ $\mu\text{L}$ 濃度になるようにtrypsin (Promega, sequencing grade)を5 mM塩化カルシウムを含む50 mM重炭酸アンモニウム溶液で溶解した。

#### ESI-MS/MSによるタンパク質の同定

ESI-MS/MS分析は、Micromass Q-ToF Ultima Global mass spectrometerを用いpositive ion条件で測定した。分析試料はメタルチップに注入し、直接イオンソースに導入した。装置条件は、イオンソース温度が $80^\circ\text{C}$ 、コーン電圧が80 Vであった。なお、タンパク質の同定は、MS/MS解析のデータを元にNCBIのデータベースを検索して行った。

#### 血液学、血液生化学および病理学的検査

14日間反復投与試験終了後に各群の全生存動物について、エーテルの深麻酔下で後大静脈より採血した後、腹大動脈および後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。

血液学的検査は、採取した血液を総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Bayer Corporation, NY, U.S.A.)で分析した。検査項目は、ヘマトクリット値(Ht)、血色素量(Hb)、赤血球数(RBC)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、赤血球分布幅(RDW)、赤血球血色素量分布幅



(HDW), 血小板数 (PLT), 平均血小板容積 (MPV), 血小板容積分布幅 (PDW), プレートレットクリット (PCT), 平均血小板成分濃度 (MPC), 血小板成分濃度分布幅 (PCDW), 平均血小板成分含量 (MPM), 血小板成分含量分布幅 (PMDW), 網赤血球数 (Retics), 平均網赤血球ヘモグロビン含量 (CHR, 平均網赤血球容積 (MCVr), 白血球数 (WBC), 好中球 (N), リンパ球 (L), 単球 (M), 好酸球 (E), 好塩基球 (B), 大型非染色球 (LUC) を測定した。

血液生化学検査は, 採取した血液をヘパリン処理して得られた血漿を用い, JCA-BMI250 自動分析装置 (日本電子株式会社, 東京都) で分析した。検査項目は, アルカリホスファターゼ (ALP), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT),  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGTP), クレアチニン (Creat), 尿素窒素 (BUN), 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), グロブリン (Glob), アルブミン/グロブリン比 (A/G ration), 血糖 (Gluc), 総コレステロール (T.Chol), トリグリセライド (TG), 総ビリルビン (T.Bil), カルシウム (Ca), 無機リン (P), ナトリウム (Na), カリウム (K), 塩素 (Cl) を測定した。

臓器重量は, 採血及び剖検後, 各臓器の固定前の重量 (絶対重量) を測定した。これらの値と最終体重から比体重値 (相対重量) を測定した。

病理組織学的検査は, 常法に従って作成したパラフィン包埋切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本を施して光学顕微鏡下で観察した。

#### 免疫組織化学染色法

剖検で採取した肝臓をホルマリン固定後, 常法に従いパラフィン包埋切片を作製した。免疫

染色はストレプトアビジンビオチン法を用いて実施し, また賦活化処理として, 切片を 0.01N のクエン酸塩緩衝液に浸し, マイクロウェーブ (MW) (95°C, 5分を2回もしくは90°C, 10分を1回)による熱処理を実施した。発現タンパク質の検出には, CYP1A1 (Santa Cruz), CYP1A2 (Santa Cruz), anti-human CYP2B6 and rat CYP2B1/2 (Chemicon International), CYP4A1 (Biomol International)の4種の抗体を用いた。

#### 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<sup>V</sup> 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<sup>V</sup> 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- $\gamma$  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<sup>V</sup> 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<sup>V</sup> 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 (Tables 1 and 2)。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- $\gamma$ 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 $\alpha$ -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- $\gamma$  の有意な減少が認められた。抑制性サイトカイン TGF- $\beta$  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- $\gamma$  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. 7A)。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タンブロッ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 抗体を用いウエスタンブロッティングした。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. 7B)。

#### プロアントシアニジンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

ブドウ由来ブドウプロアントシアニジンは、高分子画分と低分子画分について、RBL2H3 細胞からの脱顆粒を検討したところ、高分子画分 (GSP-H) にのみ脱顆粒抑制効果が見られた (Fig.1)。RBL-2H3 細胞にヒト IgE 受容体各サブユニット ( $\alpha, \beta, \gamma 2$ ) を組み込んだ RBL-SX38 細胞では、若干効果は弱いものの、同様に高分子に活性が見られた。マウス耳介肥厚測定においても、GSP-H は有意に抑制効果が見られた。GSP のようなプロアントシアニジンは酵素やタンパク質に非特異的に吸着することが知られており、今回の場合も脱顆粒そのものが抑制されているのか  $\beta$ -hexosaminidase 活性測定を妨害しているだけなのかは不明であったことから、測定原理の異なるヒスタミン遊離量と比較したところ  $\beta$ -hexosaminidase 活性測定と同じ結果であった。このことから、GSP-H は純粋に脱顆粒を押さえていると考えられ

た。

脱顆粒抑制効果のメカニズムについて、まずプロアントシアニジンのIgE受容体(FcεRI)を介したシグナル伝達に与える影響について検討した。その結果、DNP-HSA抗原刺激によるIgE受容体を介したSyk, PLCγ1, PLCγ2のリン酸化は、GSP-H前処理によって抑制されなかった

(Fig.2)。次に、プロアントシアニジンの細胞骨格系に与える影響について検討した。その結果、抗原刺激によって誘導されるアクチン再構成(膜ラフリング)がプロアントシアニジン(25-50 μg/mL)によって抑制されることが分かった。この効果は、低分子量画分には見られなかった(Fig.3)。

ブラジル産および中国産プロポリスについて、水およびエタノール抽出物について脱顆粒抑制効果を検討した。その結果、中国産プロポリス(C)のエタノール抽出物に低濃度で活性が見られた。そこで、脱顆粒抑制を指標にさらに分画精製し、Fr.C-1~Fr.C-6を得た。これらについて同様に肥満細胞からの脱顆粒抑制効果(IC<sub>50</sub>)を調べたところ、Fr.C-4,5が強く(5.56, 1.69 μg/mL)、特にFr.C-5はCAPE単独より低濃度で有効であった。また、微量のcaffeic acid phenyester (CAPE)を含むことが分かった。(Figs.4,5,6)

#### コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

##### 血清中抗原特異的抗体価の測定

抗原として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。400 mg/kg/dayでCSを経口投与した群における血清中抗原特異的抗体価に及ぼす影響をFig.1に示す。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。

一方、2%CS任意摂取群においては、Fig.2に示すように、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。

##### 血清中遊離ヒスタミンの測定

CS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、Fig.3に示すように、CS投与群は、コントロール群と比較して、血清中ヒスタミンの遊離を有意に抑制した。

##### 抗原誘発耳介浮腫に及ぼす影響

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。Fig.4にCS経口投与によるマウス耳介肥厚に及ぼす影響を示す。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。

##### 腸管免疫細胞組成に及ぼす影響

抗アレルギー活性が示されたマウスの免疫担当細胞のうち、粘膜免疫系に高頻度に存在するIELを単離し、抗アレルギー活性に関与する細胞表面抗原組成をFCMで解析した。2次免疫応答後のIELの表面抗原組成比をTable1に示す。400 mg/kg/day経口群のIELは、コントロール群のIELと比較してCD4陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。更に、2%CS任意摂取群のIELは、コントロール群と比較して、TCRαβ陽性細胞、CD4陽性細胞組成比の有意な増加が観察された。

##### 脾細胞に及ぼす影響

OVAによる2次免疫応答を確認した後、2%CSを任意に経口摂取させたマウスの脾臓を摘出し、脾細胞の表面抗原組成比をFCMで解析した。結果をTable2に示す。2%CS任意摂取マウスの脾細胞は、コントロール群の脾細胞と比較して、成熟T細胞の指標であるCD3ε(145-2C11)陽性細胞組成比の増加、

B細胞の指標であるCD45R/B220 (RA3-6B2)陽性細胞組成比の減少が認められた。また、T細胞のサブセット解析においてはCD4(L3T4, H129.19)陽性細胞、CD8α(Ly-2, 53-6.7)陽性細胞及びCD25陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。

また、CSの経口投与によるサイトカイン産生能へ及ぼす影響を検討するため、2%CS任意摂取マウスの脾臓を2次感作後8日後に摘出してOVA存在下(最終濃度100 ppm)で培養し、培地中に産生される各種サイトカインをELISAで定量した。その結果、Fig. 5に示すように、コントロール群と比較して、2%CS任意摂取マウスの培養脾細胞はTh1型サイトカインであるIFN-γ及びIL-2の産生には変化が認められなかったものの、Th2型サイトカインであるIL-5、IL-10及びIL-13産生を有意に抑制することが明らかとなった。また、FCMで有意な増加が認められた抑制性T細胞から産生されると考えられるTGF-βは、コントロール群と比較して有意な増加が認められた。

バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

#### 単回投与の影響

投与試料にしたウコン中の3種のクルクミノイド含量を表1に示す。乾燥重量当たりの含量は、bisdemethoxycurcuminが0.23 mg/g、demethoxycurcuminが0.82 mg/g、curcuminが5.54 mg/gで、3種の合計は6.59 mg/gであった。

5匹の雌ラットにウコン5,000 mg/kgを単回投与した結果、全ての個体で臨床症状は認められず、体重も順調に増加した(表2)。観察期間終了時(投与後14日)に行った剖検で、対照群において左腎臓の腎盂拡張(1/5)および水腎症(1/5)が認められ、ウコン投与群でも、腎臓でHD結節(1/5)が認められたが、いずれも正常な動物でも認められる所見であることから、ウコンまたは溶媒として用いたコーンオイルによるものではないと判断した。なお投与試験は、雄ラットについても実施したが、雌ラットと同様に死亡例はなかった。

ラット血液中のバイオマーカーを検索するために、まず市販のキットを用いて血漿中のアルブミンを除去した。アルブミンを除去した試料を用いることにより、以下に述べるように試料の直接

導入によるESI-MS/MS分析でも数種のタンパク質が同定できた。

ESI-MS/MS分析法を用いたタンパク質同定法として、メタルチップに分析試料を注入し、直接イオンソースに導入する方法を検討した。ウコン投与群と対照群にそれぞれ含まれるタンパク質を同定した結果を表3および4に示す。なお、実験には感受性が高いとされる雌ラットの血液を用いた。対照群では、含まれるタンパク質の候補として25種類が示され、「hemopexin」、「Alpha-1-inhibitor III precursor. 推定」および「Cc1-8」の3種が有意に同定された。一方、ウコンを5,000 mg/kg投与した群では、19種類の候補が示され、その中で「liver regeneration-related protein LRRG03」、「transferrin, 推定」、「hemopexin」および「serine protease inhibitor alpha 1」の4種が有意に同定された。

#### 14日反復投与の影響

##### 飼育の概要

一般状態の観察では、対照群および被験物質投与群において異常は認められなかった。死亡率は、試験期間中、5,000 mg/kg/day投与群で投与ミスによる1例の死亡が認められたが、被験物質投与に起因する死亡は認められなかった。体重は、対照群と比較して、全ての被験物質投与群で有意な体重の変化は認められなかった。摂餌量も、対照群と比較して、全ての被験物質投与群で有意な摂餌量の変化は認められなかった。

##### 血液学的検査 (Table 5-1, 5-2 および 5-3)

2,500 mg/kg/day投与群において、白血球数および白血球ディファレンションカウントの好中球数の有意な増加が認められた。それ以外の試験群では、統計学的有意な変化は認められなかった。

##### 血液生化学的検査 (Table 6-1 および 62)

・被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目および関連項目を以下

に示す。

- ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) は, 1,000 mg/kg/day と 2,500 mg/kg/day 投与群で減少傾向を示し, 5,000 mg/kg/day 投与群では有意に減少した。
- ・総ビリルビン (T.Bil) は, 1,000 mg/kg/day と 2,500 mg/kg/day 投与群で有意に減少したが, 5,000 mg/kg/day 投与群では対照群との有意差は認められなかった。
- ・総蛋白, アルブミン (Alb) および総コレステロール (T.Chol) は, 2,500 mg/kg/day 投与群で増加傾向を示し, 5,000 mg/kg/day 投与群では有意に増加した。
- ・被験物質投与群では, カリウム (K) の増加傾向がみられたが, 有意差が認められたのは 1,000 mg/kg/day 投与群のみであった。
- ・リン (P) については, 2,500 mg/kg/day 投与群で有意な増加が認められたが, 5,000 mg/kg/day 投与群では対照群との差は認められなかった。

#### 臓器重量 (Tables 7 and 8)

2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群では, 対照群に対して肝臓の臓器重量の有意な増加が認められたが, 1,000 mg/kg 用量群では, 各臓器に統計学的有意差はなかった。

#### 病理組織学的検査

2,500 mg/kg/day 投与群において 2 例, 5,000 mg/kg/day 投与群では全生存例において小葉中心性肝細胞肥大が認められた。典型的な病理組織像を写真図版に示す。最高用量におけるこの病理学的変化は統計学的にも有意な変化であった。またコーンオイルを 2 回投与した群では 1 例に小葉周辺性肝細胞の空胞化が認められた。

#### 肝臓組織の薬物代謝酵素の発現

対照群においては, 小葉中心性に CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 の軽微な発現が認めら

れた。被験物質投与動物における CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 の発現は小葉中心性から瀰漫性に認められた。CYP2B6・CYP2B1/2 の発現は被験物質投与群で, 用量相関性に強く発現し, 投与した群において活性化を示唆する肥大した肝細胞と一致した発現を認めた。一方, CYP4A1 では用量相関性を示す発現は認められなかった。

#### D. 考察

##### リンゴプロシアニジンの検討

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 $\delta$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

##### プロアントシアニンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

プロアントシアニンに関して, これまでの研究でリンゴ由来, ブドウ由来のものを用いて比較検討してきた。リンゴ由来同様に, ブドウ由来プロアントシアニンは, 肥満細胞からの脱顆粒を抑制した。その抑制効果のほぼ同じ強

さであった。両者の構造上の相違点は、重合体構成単位である(エピ)カテキンの3'位に没食子酸がエステル結合しているか(ブドウ由来)していないか(リンゴ由来)である。Iv vivoでのブドウ由来プロアントシアニジンを用いた耳介肥厚試験においてもリンゴ由来プロアントシアニジン同様の抑制効果が見られたことから、プロアントシアニジンの抗アレルギー作用は、カテキンの部分構造は重要ではなくその重合度が重要であることが強く示唆された。そのメカニズムに関しては、肥満細胞を用いたin vitroでの検討から、プロアントシアニジンは細胞内シグナルに影響しないものの抗原刺激により誘導される膜ラフリングを抑制することで脱顆粒を抑制することが分かった。しかしながら、その脱顆粒抑制濃度は25 µg/mLと比較的高いこと、プロアントシアニジンの吸収性からそれ以外の基与も考えられた。初年度のin vivo実験からリンゴプロアントシアニジンはIL-2, IL-12, IFN-γなどTh1型サイトカイン産生には影響しなかったが、IL-5, IL-6のTh2型サイトカインを抑制され、Th2型分化が抑えられていることが分かった。これらの結果を総合すると、プロアントシアニジンは、腸管免疫系に作用しTh1/Th2バランスにおいてTh2抑制的に働き、一方微量の吸収されたプロアントシアニジンは肥満細胞などに作用しヒスタミン遊離を抑制するものと考えられた。

プロポリスに関しては、近年抗アレルギー作用が期待されることとして注目されていることから、その成分検索を行った。抗がん作用が期待されるartepillin Cなどプレニル側鎖を持つ桂皮酸が主成分のブラジル産に比較してchrisinなどフラボノイドが主成分と考えられる中国産では、中国産の方が、肥満細胞からの脱顆粒抑制効果は高かった。この中国産プロポリスにはすでに脱顆粒抑制効果が知られている caffeic acid phenyl ester (CAPE) が、活性画分であるFr-C-5にも微量含有しているが主成分はUV吸収などの結果から、CAPE以外のフラボノイドと考えられ、新たな抗アレルギー作用物質と考えられた。

アレルギー患者の数は、近年日本や欧米でも増加の一途を辿り、総人口の20%前後に達している。抗アレルギー薬の開発は多角的に検討され、特にIgE-肥満細胞系によって生じるI型のアレルギー応答に対する抗アレルギー薬として多くの薬剤が開発されてきた。古典的な抗ヒスタミン薬の開発に始まり、肥満細胞からの化学伝達物質遊離を広く抑制する化学伝達物質遊離抑制薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬やトロンボキサン合成阻害薬・受容体拮抗薬、サイトカイン産生抑制薬が開発されてきたが、全てのアレルギー反応において未だに十分に満足する薬が見出されていないのが現状である。今回検討したプロアントシアニジンやプロポリスは、作用機序や作用部位が明確でないものの明らかな効果が期待できる可能性があることが、本研究で明らかにすることができた。

#### コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

これまでの研究において、生体外から投与したCSの抗炎症活性の作用機序は、炎症局所における結合組織成分や軟骨基質の生合成刺激、タンパク質分解酵素の阻害、有害アミンの吸着捕捉効果によるものと考えられていた。また、外因性CSはヒアルロン酸と相まって大きな保水性を発揮し、軟骨滑液と軟骨組織中に適切な湿潤環境を与えることから、CSの関節炎治療を対象とした研究は生化学的、物理化学的な内容に終始し、CSの経口摂取による抗炎症活性を免疫学的な側面から考究した知見は得られていなかった。また、in vitroにおけるCSの抗炎症効果を検討した実験において、CSがヒト白血球から得た中性プロテアーゼ、カテプシンB<sub>1</sub>、エラスターゼ活性を阻害することが認められ、ウサギ膝実験的変形性関節症の関節腔へグリコサミノグリカン多硫酸エステルを1週1回10週注入することにより、非投与群の変形性膝関節症膝よりも軟骨変性を抑制することが観察されている。しかしながら、インドール酢酸系非ステロイド性抗炎症薬として有名なインドメタシンについても中性プロテアーゼ、コラゲナーゼ活性を抑制することが報告されていることもあり、リゾソーム酵素活性阻害と軟骨変性抑制との因果関係

に関しては明らかにされていない。また、グリコサミノグリカン多硫酸エステルもカテプシン B<sub>1</sub> のコラーゲン分解活性をインドメタシンと同様に阻害することが報告されているが、これが変形性関節症に対して有利であるか、不利であるかに関しては疑問が残る。炎症性疾患を持つ患者数は増加の一途を辿り、世界で慢性関節リウマチ患者は 700 万人、喘息患者は 3,400 万人にのぼると言われている。現在のステロイド系の抗炎症剤はその有効性、安全性が限られていることから、より高効率で安全性の高い抗炎症治療剤の開発が待たれていることをふまえると、CS の薬理効果の解明が急務であると考えられる。

アレルギー疾患の頻度は、近年の統計によると、日本のみならず欧米においても増加の一途を辿り、控えめに見積もっても総人口の 20%前後にもものぼる人々が何らかのアレルギー性疾患を煩っているといわれている。アレルギー疾患の治療に用いられる抗アレルギー薬の開発は多角的に検討され、特に IgE-肥満細胞系によって生じる I 型のアレルギー応答に対する抗アレルギー薬として多くの薬剤が開発されてきた。それらは肥満細胞から遊離されるヒスタミンに対して拮抗的な作用を有する古典的な抗ヒスタミン薬の開発に始まり、肥満細胞からの化学伝達物質遊離を広く抑制する化学伝達物質遊離抑制薬が開発されたが、全てのアレルギー反応において未だに十分に満足する薬剤が見出されていないのが現状である。現在では更に多様化し、ロイコトリエン受容体拮抗薬やトロンボキサン合成阻害薬・受容体拮抗薬、サイトカイン産生抑制薬などが次々と開発されている。アレルギーモデルマウスを用いた本研究において、CS の経口投与は血清中抗原特異的 IgE、IgG<sub>1</sub> 抗体価、血清中ヒスタミン遊離及び接触性アレルギーの抑制を示し、CS に抗アレルギー活性が賦与されることが初めて見出された。また、抗アレルギー活性が呈示されたマウスの免疫担当細胞の表面抗原組成を解析し、粘膜免疫系において IEL の TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞、CD4 陽性細胞の組成比が有意に増加したことから、CS の抗アレルギー活性発現に対する TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞、CD4 陽性細胞の関与が示唆された。近年の研究において、IEL の性状と発生・分化に関し、その特殊性が解明されてきたが、IEL 中の T 細胞の機能、とくに腸管免疫機構における役

割に関してはまだ詳細は不明である。本研究において得られた新規知見である、CS の抗アレルギー活性発現に対する TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞、CD4 陽性細胞の関与は、腸管免疫機構における IEL の機能解明に役立つものとなるであろう。また、CS の経口投与が全身性免疫系に及ぼす影響を明らかにするために、CS を自由に摂取させたアレルギーモデルマウスの脾細胞表面抗原を FCM で解析した。その結果、CD3 $\epsilon$ 陽性細胞組成比の増加、CD45R/B220 陽性細胞組成比の減少が認められ、T 細胞サブセットの解析では CD4 陽性細胞、CD8 $\alpha$ 陽性細胞及び CD25 陽性細胞組成比の有意な増加が認められた。本研究において示した CS 経口投与による血清中抗原特異的 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 抗体価の有意な抑制は、全身性免疫系において、それら抗原特異的抗体を産生する B 細胞機能の抑制が要因となっていることが考えられた。また、我々はこれまでに *in vitro* の実験系において、OVA 免疫感作マウス脾細胞を CS と共に培養した後に、細胞表面抗原を解析したところ、T 細胞組成比に増加が認められ、そのサブセットでは、CD4 陽性細胞の増加、CD8 $\alpha$ 陽性細胞の抑制を確認している。これらの実験では生体内における免疫応答を模倣した系を考慮したが、CS の自由経口投与による生体内の免疫応答と、CS の抗原感作脾細胞との直接的な相互作用は異なる機序であると考えられた。

#### バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

実験に用いたウコン(種子島系)の curcumin 含量は、5.54 mg/g(0.55 %)で、市場品(0.10-1.79 %と報告されている<sup>1)</sup>)と比較するとやや低いと思われる。

急性経口毒性試験に準じてウコンをラットに投与した結果、死亡は雌雄ともに認められなかった。臨床症状の観察で異常は認められなかった。また体重は投与後7日および14日目ともに全例で増加しており、一般状態の良好な推移を反映していた。一方、観察期間終了時に行った剖検では対照群で左側腎臓の腎盂拡張および水腎症が、またウコン投与群で肝臓にHD結節が認められたが、これらの所見は、正常のWistarHannover系SPFラッ



ト(BrHan:WIST@Jcl(GALAS))でも認められること、また当該試験における臨床症状の観察で異常が認められなかったことから、被験物質または溶媒による影響ではないと判断した。以上の結果から、ウコン5,000 mg/kgの単回投与では、ラットに対して毒性は認められないと判断した。

ESI-MS/MS分析法を用いた血漿画分中のタンパク質の同定を行うため、試料調製法および装置条件を検討した。血漿中には、アルブミンが50-60 %程度含まれ、アルブミン存在下ではESI-MS/MS分析法は、測定感度が低下することが予測される。そこで、ラットアルブミンを特異的に吸着する担体を用いて血漿画分のアルブミンを除去した。アルブミンを除去することで、粗精製の血漿画分であっても、MSへの直接導入によって数種のタンパク質が同定できた。対照群では、25種の候補から3種が有意に同定され、投与群では、19種の候補から4種が有意に同定できることが示された。

しかし、同定されたタンパク質の種類が非常に少ないことから、今回用いた方法では、有効なバイオマーカーを検索することはできないと判断した。バイオマーカーとなるタンパク質・ペプチドの候補を検索するためには、多くのタンパク質、ペプチドを検出、同定する必要がある。分析時のペプチドフラグメントの分離能、検出力を向上させる必要がある。今後、トリプシン処理した試料を陽イオン交換クロマトグラフィーなどで分画した上で、画分毎に逆相カラムを用いたLC-MS/MS分析を行うことが必要であると思われる。

ウコンをラットに14日間反復経口投与した際の、生化学的、組織化学的変化を調べ、肝臓組織における免疫染色法を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検索を行った。試験期間中、5,000 mg/kg/day投与群において、動物の死亡および一般状態の観察で異常は認められなかった。

体重は対照群と比較して全ての被験物質投与群で有意な変化は認められなかった。また摂餌量においても同様に統計学的有意差は認められ

なかった。ただし、全ての群における体重および摂餌量は増加したが、コーンオイルを2回投与した対照群および5,000 mg/kg/day投与群における摂餌量は他の群と比較して少なかった。これはコーンオイルまたは被験物質を2回投与することにより、満腹な状態が継続し、食欲が抑制されたためと考えた。

血液学的検査では白血球数および白血球のディファレンシャルカウントにおける好中球数が2,500 mg/kg/day投与群で対照群に比べて有意な増加を示した。また、血液生化学的検査では、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、総タンパク(TP)、アルブミン(Alb)、総コレステロール(T.Chol)、総ビリルビン(T.Bil)、リン(P)、カリウム(K)の各項目において、対照群に比べて有意な変化が認められた。5,000 mg/kg/day投与群で有意な減少を示したアスパラギン酸アミノ基転移酵素は、肝障害の指標の一つであるが、心筋、骨格筋、赤血球などにも高濃度に分布していることから、肝臓特異性は低く、またその値が低い場合、臨床及び毒性学的意義は乏しいとされている。一方、5,000 mg/kg/day投与群では総タンパク(T.Chol)、アルブミン(Alb)、総コレステロール(T.Chol)値が有意に増加した。総タンパクおよびアルブミンは脱水などによる血液濃縮によって見かけ上増加する可能性があるが、実量が真に増加することはほとんどなく、減少が問題となるといわれている。本試験ではヘモグロビン、ヘマトクリット値が正常であったことから総タンパクおよびアルブミン値の増加は脱水などによるものではないと判断した。さらに総コレステロールが有意に増加していたことから、被験物質を2回投与したことによるものと考えた。しかし、コーンオイル2回投与の群と1回投与の群との間に差は認められなかったことから、コーンオイルによる影響を否定し、被験物質の影響であると考えた。つまり、高濃度のウコンを投与することにより肝臓におけるタンパクおよび

コレステロール合成が亢進したためと考えた。  
観察期間終了後に行った最終解剖時の臓器重量の測定では、2,500, 5,000 mg/kg/day 投与群で肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。剖検時の肉眼所見では異常は認められなかったが、病理組織学的検索では小葉中心性肝細胞肥大が 2,500 mg/kg/day (2/4 例), 5,000 mg/kg/day (3/3 例) 投与群で認められた。さらに、対照群および各投与群では肝細胞の空胞化が認められた。特にコーンオイルを2回投与した群では小葉周辺性肝細胞の空胞化が散見された(1/4 例)。対照群および各投与群で散見された空胞は、過剰なオイルを摂取したことにより、肝細胞に脂肪が蓄積されたと考えた。一方、2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群における肝細胞の肥大は用量相関的であること、また血液生化学的検査の結果と合わせると、被験物質投与による刺激で肝細胞が活性化されたため、細胞の大きさが増したと考えた。

バイオマーカーを検索する目的で、免疫組織化学染色法を用いウコン投与によって肝臓組織に特異的に発現するタンパク質を検索した。本報告では薬物代謝酵素に着目し、CYP1A1, CYP1A2, anti-human CYP2B6 and rat CYP2B1/2, CYP4A1 の発現を確認した。特に、CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 は脂質代謝に関与することが知られている。本試験では、肝臓組織において、薬物代謝酵素である CYP1A1 および CYP1A2 の発現は認められなかった。一方、CYP2B6・CYP2B1/2 と CYP4A1 は、肥大した肝細胞または空胞が形成された肝細胞などに一致して発現した。また、CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 の発現は、被験物質投与群の間において用量相関性を示し、被験物質によって発現の程度が異なる結果が得られた。以上のことから、ウコンは肝臓の脂質代謝に何らかの影響に及ぼすことが示唆された。しかし、CYP1A1 および CYP1A2 の発現が認められなかった理由、ま

た肝臓の脂質代謝に影響を及ぼす機序については詳細な検討が必要であると考えた。

## E. 結論

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、機能的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。

## プロアントシアニジンおよびプロポリスの抗アレルギー作用に関する検討

繰り返し構成単位の部分構造がことなるカテキン重合体であるプロアントシアニジンを用いて *in vitro*, *in vivo* で比較検討した結果、部分構造よりも重合度が活性発現に重要であると考えられた。プロアントシアニジンは細胞内シグナルにはほとんど影響を与えないものの、抗原刺激により誘導される膜ラフリングやアクチン再構成を抑制することで脱顆粒を抑制することが分かった。しかしながら、その脱顆粒抑制濃度は 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  あるいはそれ以上と比較的高い。リンゴプロアントシアニジンは Th1 型サイトカイン産生には影響しないが、Th2 型サイトカインを抑制することから、腸管免疫系に作用し Th1/Th2 バランスにおいて Th2 抑制的に働き、一方微量の吸収されたプロアントシアニジンは肥満細胞などに作用しヒ

スタミン遊離を抑制するものと考えられた。

#### コンドロイチン硫酸の抗アレルギー作用に関する検討

血清中抗原特異的IgE及びIgG<sub>1</sub>抗体価、血清中遊離ヒスタミン、接触性アレルギーを指標として、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、疾患に抑制が認められ、抗アレルギー活性の賦与が示唆された。また、抗アレルギー活性が呈示されたマウスの免疫担当細胞の表面抗原解析を試みたところ、CSを経口投与したマウスでは粘膜免疫系における腸管上皮間リンパ球上のTCRαβ陽性細胞、CD4陽性細胞の組成比の有意な増加が観察された。また、全身性免疫系においては脾細胞上CD3ε陽性細胞組成比の増加、CD45R/B220陽性細胞組成比の減少が観察され、それら免疫担当細胞の抗アレルギー活性への関与が示唆された。また、2次免疫応答後に脾臓を摘出し、*in vitro*におけるサイトカイン産生能について検討したところ、CSを経口投与したマウスの培養脾細胞はTh2型サイトカイン産生に抑制が認められた。臨床試験において有効性の効果は評価可能であるが、有効性の腸管免疫系に関与するメカニズム解析はマーカー測定のための検体試料が血清・尿等に限られるので、困難であることが示唆される。そのため有効性のメカニズム解析は、今回の検討したように小動物を用いた*in vivo*試験による詳細な解析、培養細胞等の*in vitro*試験で補完する必要があると思われる。

#### バイオマーカーを利用したウコン属植物の評価系の開発に関する研究

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。

Wistar Hannover系SPFラットの雌雄にクルクミノイド6.59 mg/gを含むウコン5,000 mg/kgを単回投与しても急性経口毒性は認められなかった。

ESI-MS/MS を用いたタンパク質の同定法では、アルブミンを除去することで、粗精製の血漿画分であっても、数種のタンパク質が同定できたが、適当なバイオマーカーの検索には、イオン交換クロマト等による前分画と、LC-MS/MS 分析が必要である。

ウコンの Wistar Hannover 系 SPF ラット (BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)) における 14 日間反復経口投与毒性試験では 5,000 mg/kg の用量においても毒性学的意義のある変化は認められなかった。

2,500 および 5,000 mg/kg/day 投与群において肝細胞の肥大が用量相関的に認められた。肝細胞の肥大は、摂餌量、血液生化学的検査および病理組織学的検査においてウコンの投与による影響を示唆する結果であった。

免疫組織化学法によって薬物代謝酵素の CYP2B6・CYP2B1/2 と CYP4A1 は、肥大した肝細胞または空胞が形成された肝細胞などに一致して発現した。また、ウコンの投与量と CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 が用量相関性を示した。CYP2B6・CYP2B1/2 および CYP4A1 は、バイオマーカーの候補として利用できると考えられるが、ウコン投与による因果関係や作用機作の解明にはさらに詳細な研究が必要であると思われる。

## F. 研究発表

### 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)
3. 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).
4. 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).
5. Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice. Teshima, R., Okunuki, H., Sato, Y., Akiyama, H., Maitani, T., Sawada J., *Allergology International*, 55, 43-48 (2006).
6. Sakai, S., Akiyama, H., Sato, Y., Yoshioka, Y., Linhardt, R. J., Goda, Y., Maitani, T., Toida, T., "Chondroitin Sulfate Intake Inhibits the IgE-mediated Allergic Response by Down-regulating Th2 Responses in Mice" *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 19872-19880 (2006)
7. Kusano, S., Igarashi, N., Sakai, S., Toida, T., "Effect of Orally Administered Chondrosine on

Uptake of <sup>35</sup>S Sulfate into Mice Cartilage" *Journal of Pharmaceutical Society of JAPAN*, 126, 297-300 (2006)

8. Akiyama H, Kondo K. Agaritine and phenylhydrazine derivatives in *Agaricus bisporus* and *Agaricus blazei* Murrill. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 48, 397-401 (2007).
9. Kondo K, Watanabe A, Akiyama H, Maitani T. The metabolisms of agaritine, a mushroom hydrazine in mice. *Food Chem Toxicol.* 46, 854-62. (2008).

### 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<sup>1</sup>、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
5. 五十嵐尚子、竹口敦子、酒井信夫、豊田英尚、戸井田敏彦。"コンドロイチン硫酸 Th1 促進活性における分子量の影響" 日本薬学会第126年会、仙台、2006年3月