

抗炎症作用を有する食品成分の検索と解析

奥和之^{*1} 宮田富弘^{*1} 三浦紀称嗣^{*2} 山口大貴^{*2}

要 約

本研究では、腸管上皮細胞が産生する炎症性サイトカイン分泌を抑制し、抗炎症性を示す食品成分の検索を行った。腸管上皮モデル Caco-2細胞を用いて TNF- α による細胞障害性とサイトカイン分泌亢進に対する影響について検討したところ、大麦若葉末、ホウレン草の75%エタノール抽出物に細胞障害抑制と炎症性サイトカイン分泌抑制が認められた。また、大麦若葉末およびホウレン草由来糖脂質を添加することによって、細胞障害性および炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) 産生が顕著に抑制した。以上の結果から、大麦若葉末由来糖脂質は炎症性腸疾患を抑制することが示唆された。

1. 緒言

炎症性腸疾患 (IBD : inflammatory bowel disease) は、主に若年層を中心にその罹患率が急激に増加している疾患である。IBD は潰瘍性大腸炎とクローン病が含まれるが、いずれもストレスなど外的因子に対する腸管自律神経あるいは腸管免疫の異常による炎症メディエーターを介した腸管の微小循環障害・組織破壊によると考えられる¹⁾。すなわち異常亢進したマクロファージなどが産生する tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) といった炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、腸管上皮細胞はこれらの刺激によってさらに好中球の遊走に関与する interleukin-8 (IL-8) を分泌、その結果腸管粘膜組織に好中球が浸潤・集積し腸管上皮に細胞傷害をもたらすことによって、腸炎症状が進展することが知られている²⁾。光合成をする微生物や高等植物の葉緑体チラコイド膜には、特有の糖脂質が含まれており、特にホウレン草由来のチラコイド糖脂質には、DNA 合成酵素阻害による抗がん作用や消化管粘膜の増加による腸バリア機能の増強作用が報告されている³⁾。また、桑の葉や杜仲茶葉はポリフェノールを多く含んでおり、糖の消化吸収阻害など腸管での生理機能が期待される^{4,5)}。本研究に用いる大麦若葉末は、イネ科オオムギ属に属するオオムギ (*Hordeum vulgare* L.)

の若葉部を乾燥、粉碎したものであり、SDF の β -グルカンや IDF のヘミセルロースなどの食物繊維を豊富に含んでいるほか、脂質 (脂質・糖脂質) を約 20% 含有しており、炎症性腸疾患の治療・予防に効果が期待される。本研究では、葉緑体チラコイド膜糖脂質に注目し、培養細胞を用いた腸管炎症モデルによる炎症抑制を示す食品成分の検索と大麦若葉由来糖脂質の抗炎症作用について検討した。

2. 方法

2.1 試料

大麦若葉末は、市販のものを東洋新薬 (株) より購入した。緑黄色野菜としてホウレン草、小松菜を、淡色野菜としてキャベツを用い、それぞれ市販のものを購入し、60℃で温風乾燥したものをブレンダーにて粉碎して使用した。ポリフェノールによる腸管機能が期待される桑の葉や杜仲茶葉は、市販の乾燥品を購入しブレンダーで粉碎した。各粉末試料 25 g を 75% エタノール 250 mL で 80℃、30 分間加熱抽出し、残渣をろ過したものを乾固して試料を調製した。また、大麦若葉末およびホウレン草の糖脂質の調製は高橋らの方法⁶⁾に準じた。大麦若葉末またはホウレン草の 75% エタノール抽出液を強カチオン交換樹脂ダイアイオン HP-20 (三菱ケミカル (株) 製) を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。75% エ

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

*2 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 健康科学専攻
(連絡先) 奥和之 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
E-mail : okukaz1803@mw.kawasaki-m.ac.jp

タノールにてカラムを通過した画分を水溶性画分として、カラムに吸着した糖脂質画分は95%エタノールにて溶出し、それぞれの溶出液を乾固させて調製した。

2.2 培養細胞を用いた腸管炎症モデルによる大麦若葉末の炎症抑制効果の検討

ヒト腸管上皮様細胞 (Caco-II) を用いて、TNF- α を炎症メディエーターとした炎症モデルによる大麦若葉末および糖脂質の抑制作用を検討した⁷⁾。Caco-II は12well-transwell に培養されたPOCA® 小腸吸収 (CACO-2, ケーエーシー (株) 製) を使用した。培養には、10% 牛胎児血清、2 mM L-グルタミン、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 μ g/mL)、非必須アミノ酸溶液を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用い、trancwell 内に2mL 添加した。試料の添加は TNF- α 処理の前培養とし、乾燥試料を75%エタノール抽出物および大麦若葉末またはハウレン草水溶性画分は10mg/mL、大麦若葉末またはハウレン草糖脂質画分は10 μ g/mL になるよう少量のエタノールで溶解後 PBS (-) で希釈し、trancwell の内側 (刷子縁膜側) に添加後、CO₂ インキュベーターで37℃、2日間培養した。TNF- α による細胞炎症誘導は、Caco-II が培養された trancwell の培地を交換したのち、内側 (刷子縁膜側) に TNF- α 10ng/mL になるよう添加し、37℃、3日間培養した。細胞障害性の評価は、細胞膜の損傷により、trancwell の外側 (基底膜側) に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) を LDH-細胞毒性テストワコー (和光純薬 (株) 製) にて測定した。また、外側 (基底膜側) に分泌されたサイトカイン (IL-6, IL-8 および IL-10) を ELISA 法により測定した。

2.3 統計処理

本研究では、各実験群を n=5 で行った。結果は平均値 \pm SD (標準偏差) で示した。各データは、統計処理ソフト SPSS (Ver. 22) を用いて、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer 法を用いて平均値を比較した。いずれの統計結果も危険率が 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意とみなした。

3. 結果

3.1 TNF- α による細胞障害性およびサイトカイン分泌に及ぼす大麦若葉末の影響

Caco-II の基底膜側に放出された LDH 活性を表1に示した。試料のみの添加 (TNF- α 未処理) では、外側 (基底膜側) の LDH 活性の増加はほとんど見られなかった (データは示していない)。TNF- α 処理後では、細胞障害による外側 (基底膜側) の

表1 TNF- α 添加による細胞障害性 (LDH 活性)

		LDH活性 (u/mL)
コントロール		61.9 \pm 4.51
YBLP	10 mg/mL	21.0 \pm 2.73 ^b
	1 mg/mL	46.0 \pm 6.08 ^b
	0.1mg/mL	54.9 \pm 4.73 ^a
ハウレン草	10 mg/mL	19.7 \pm 3.27 ^b
小松菜	10 mg/mL	55.5 \pm 4.44 ^a
キャベツ	10 mg/mL	60.4 \pm 4.19
桑の葉	10 mg/mL	18.4 \pm 2.24 ^b
杜仲茶葉	10 mg/mL	49.8 \pm 8.59 ^a

LDH 活性1u: 1分間に1 μ mol の NADH を消費する酵素量

a: コントロールに対して $p < 0.05$ で有意差あり

b: コントロールに対して $p < 0.01$ で有意差あり

LDH 活性は増大したが、大麦若葉末、ハウレン草、小松菜、桑の葉および杜仲茶葉の75%エタノール抽出物添加により低下し、特に大麦若葉末、桑の葉およびハウレン草抽出物の添加で顕著であった ($p < 0.01$)。キャベツ抽出物の添加では、TNF- α による細胞障害抑制はみられなかった。Caco-II 細胞に TNF- α を添加して炎症を起こさせた場合の外側 (基底膜側) に放出されたサイトカイン量を図1に示した。コントロール (試料無処理) では、炎症性サイトカインの IL-6や IL-8が顕著に増加したが抗炎症性サイトカインの IL-10はわずかに増加するのみであった。一方、大麦若葉末、ハウレン草および桑の葉抽出物添加では、炎症性サイトカインの IL-6と IL-8はコントロールに比べ有意に低く、特に大麦若葉末、ハウレン草および桑の葉抽出物の添加で顕著であった (いずれも $p < 0.01$)。また、抗炎症性サイトカイン IL-10分泌は、大麦若葉末抽出物の添加で有意に増加した ($p < 0.01$)。

3.2 TNF- α によるサイトカイン分泌に及ぼす大麦若葉糖脂質の影響

Caco-II 細胞に大麦若葉末またはハウレン草の糖脂質画分、水溶性画分を添加して前培養した後、TNF- α を添加して炎症を起こさせた場合の外側 (基底膜側) に放出されたサイトカイン量を図2に示した。炎症性サイトカイン IL-6および IL-8は、大麦若葉末またはハウレン草の糖脂質画分の添加によりコントロールに比べ有意に低下した (いずれも $p < 0.01$)。水溶性画分添加での IL-6および IL-8低下作用は弱かった。抗炎症性サイトカイン IL-10は、大麦若葉末の水溶性画分添加で、コントロールに比べ有意に増加した ($p < 0.01$)。

4. 考察

食品因子による生体の恒常性維持や免疫生体防

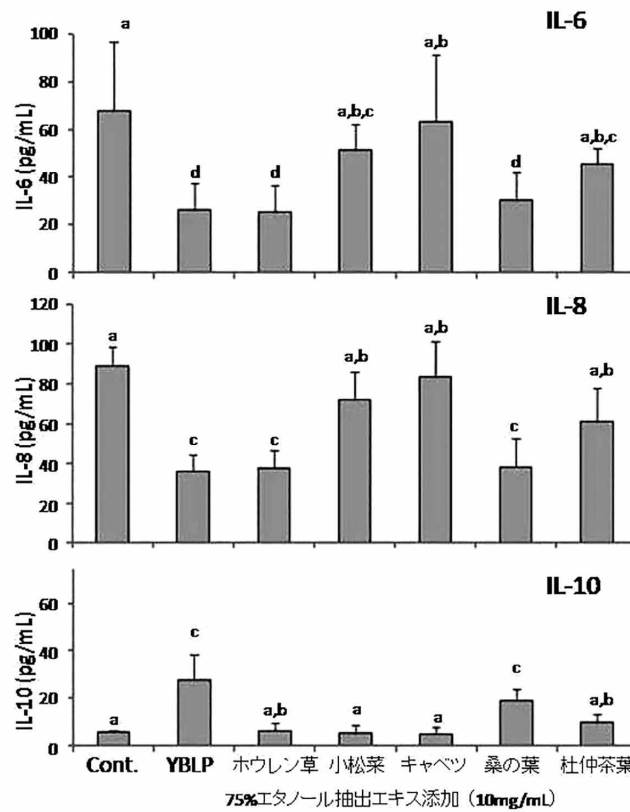


図1 基底膜側に放出されたサイトカイン濃度
YBLP：大麦若葉末懸濁液添加
異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

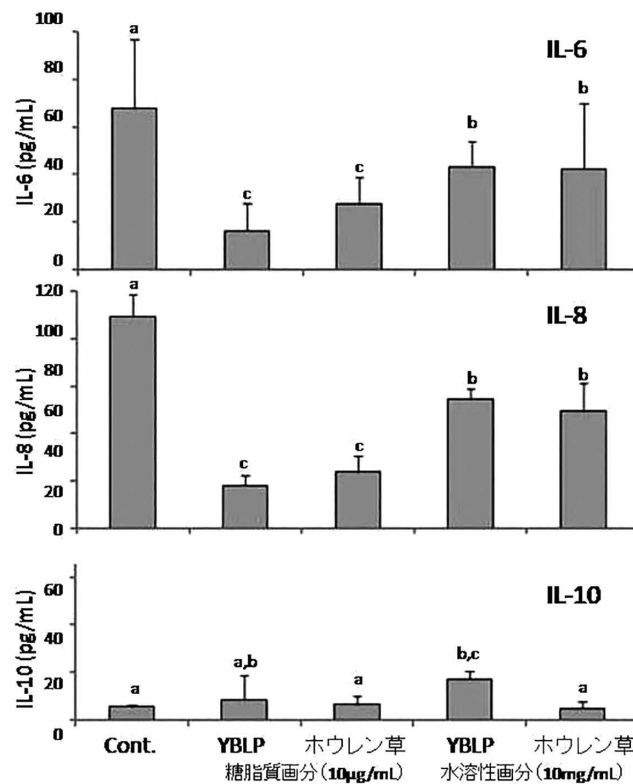


図2 大麦若葉の炎症抑制作用
YBLP：大麦若葉末懸濁液添加
異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

御能のコントロールは、免疫応答の異常が引き金となっている炎症性腸疾患（IBD）の治療およびその予防につながる¹⁾。奥らは、ヒト腸管上皮様細胞（Caco-2）を用いて、TNF- α を炎症メディエーターとして添加したIBDモデルにおいて、大麦若葉由来糖脂質がTNF- α 処理後の細胞障害と炎症性サイトカイン分泌を抑制しIBDの発症抑制に強く関与していることを報告した⁸⁾。本研究では、炎症性腸疾患モデルとして、ヒト腸管上皮様細胞（Caco-2）と炎症メディエーターとしてTNF- α による炎症抑制評価系を用いて大麦若葉末の炎症性腸疾患抑制効果を調べた。大麦若葉末、ホウレン草、小松菜、キャベツ、桑の葉および杜仲茶葉から、糖脂質を含む75%エタノール抽出物を調製し、抗炎症作用を評価したところ、大麦若葉末、ホウレン草および桑の葉抽出物に強い細胞障害抑制と炎症性サイトカイン（IL-6, IL-8）の分泌抑制が確認された。また、大麦若葉末および桑の葉抽出物添加では、抗炎症性サイトカインIL-10分泌が促進された。これらの結果から、大麦若葉末、ホウレン草および桑の葉の成分が、IBDの発症抑制に強く関与していることがわかった。次に、大麦若葉末とホウレン草のグリセロ糖脂質の作用について検討した。大麦若葉末抽出エキスとホウレン草抽出エキスより強カチオンイオン交換樹脂（HP-20）にて分画した糖脂質画分と水

溶性画分をそれぞれ培養細胞を用いた腸管炎症モデル添加したところ、大麦若葉末およびホウレン草由来糖脂質画分で炎症性サイトカイン（IL-6, IL-8）の強い分泌抑制が確認され、大麦若葉末およびホウレン草由来糖脂質に強い抗炎症作用を有することがわかった。ホウレン草由来グリセロ糖脂質には、DNA合成酵素阻害による抗がん作用や小腸上皮細胞の粘膜バリアを増強させる作用などが報告されている³⁾。消化系癌細胞の炎症拡大にはTNF- α による転写因子NF- κ Bを介したサイトカインストームと考えられ¹²⁾、グリセロ糖脂質の炎症抑制に転写因子の関与が示唆される。一方、抗炎症性サイトカインIL-10分泌は大麦若葉末の水溶性画分で確認されたが、糖脂質画分およびホウレン草の水溶性画分では見られなかった。炎症性腸疾患の炎症抑制には、外部刺激による炎症性サイトカイン産生を抑えるとともに、宿主細胞の制御性T細胞を介した抗炎症性サイトカインIL-10産生による抗炎症作用が関与する⁹⁾。大麦若葉末の水溶性画分には β グルカンやポリフェノールが含まれており（データ未公表）、これらの成分が炎症抑制に関与していることと考えられる。

以上の結果から、大麦若葉末の摂取は炎症性腸疾患における抗炎症作用を示すことが示唆された。

謝 辞

本研究は平成30年度川崎医療福祉研究費の助成により行われたものである。

利益相反（COI）

本研究は開示すべき利益相反（COI）関係にある企業等はない。

文 献

- 1) Shanahan F : Inflammatory bowel disease: Immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*, **120**(3), 622-635, 2001.
- 2) Baggiolini M, Loetscher P and Moser B : Interleukin-8 and the chemokine family. *International Journal of Immunopharmacology*, **17**, 103-108, 1995.
- 3) Mizushima Y, Kamisuki S, Mizuno T, Takemura M, Asahara H, Linn S, Yamaguchi S, Matsukage A, Hanaoka F, Yoshida S, Saneyoshi M, Sugawara F and Sakaguchi K : Dehydroaltenusin, a mammalian DNA polymerase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 33957-33961, 2000.
- 4) 阿武尚彦, 田村幸, 大野弘美, 富裕孝: 桑 (*Morus alba* L.) 葉エキスのマルターゼ, スクララーゼおよび α -アミラーゼ阻害作用について. 日本食品保蔵科学会誌, **30**(5), 223-229, 2004.
- 5) 瀬戸山実, 青木信義, 廣川隆彦: 収穫時期の異なる杜仲葉の成分とその機能性. 日本食生活学会誌, **29**(2), 105-110, 2018.
- 6) Takahashi S, Kamisuki S, Mizushima Y, Sakaguchi K, Sugawara F and Nakata T : Total synthesis of dehydroaltenusin. *Tetrahedron Letters*, **449**, 1875-1877, 2003.
- 7) 清水誠: 消化管由来培養細胞を用いた食品成分の腸管吸収性評価. 日本栄養・食糧学会誌, **56**(4), 251-255, 2003.
- 8) 奥和之, 川崎靖子, 三浦紀称嗣, 山岡伸: 培養細胞を用いた大麦若葉末の炎症性腸疾患抑制作用. 川崎医療福祉学会誌, **27**(2), 385-391, 2018.

- 9) Chinen T, Komai K, Muto G, Morita R, Inoue N, Yoshida H, Sekiya T, Yoshida R, Nakamura K, Takayanagi R and Yoshimura A : Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance. *Nature Communications*, 2, 190, 2011.

(令和2年7月16日受理)

Search and Analysis of Food Components with Anti-inflammatory Activity

Kazuyuki OKU, Tomihiro MIYADA, Kiyoshi MIURA and Daiki YAMAGUCHI

(Accepted Jul. 16, 2020)

Key words : young barley leaf powder, glycolipid, inflammatory bowel disease, intestinal cell culture model, inflammatory cytokines

Abstract

We investigated the effects of Young barley leaf powder (YBLP), spinach and mulberry leaf components, and found that glycolipids and beta-glucans suppressed TNF- α -induced cell-cytotoxicity and inflammatory cytokine secretion in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. The increased expression levels of inflammatory cytokine IL-8 by TNF- α was almost completely suppressed by YBLP and spinach glycolipids. Furthermore, the transcriptional activity of human IL-8 promoter was increased by TNF- α treatment, and suppressed by YBLP glycolipids in a dose-dependent manner. These results show that YBLP and spinach glycolipids suppressed TNF- α -induced IL-8 production at the transcriptional level, suggesting that YBLP glycolipids are a promising component in preventing Inflammatory bowel disease.

Correspondence to : Kazuyuki OKU

Department of Clinical Nutrition
Faculty of Health Science and Technology
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-0193, Japan
E-mail : okukaz1803@mw.kawasaki-m.ac.jp
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.30, No.1, 2020 279–283)

