

# 食品成分による大腸炎関連疾患の予防

大 東 肇 ・ \*村 上 明

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻, \*近畿大学生理工学部)

## 1. はじめに

現在, 地球上の総人口は60億とも言われるほどに増加し, それと同時に世界的な高齢化社会を迎えている。そういった時代背景の大きな変化に伴い, 医学・医療の関心は結核に代表される感染症などから加齢に伴う疾病に向けられ, その発生要因, 病態解明, 早期における診断・治療の研究開発や予防対策についての研究が注目され始めている。こうした疾病予防対策は社会全体の問題としてマスコミにも大きく取り上げられ, 一般大衆の強い興味を引く話題となっている。

また, 分子生物学的, 遺伝学的研究が進み, それらが医学に応用されるようになると, これまでの集団を対象とした研究や平均的な有意差検定のみを重視する統計論では遺伝子レベルでの個々の診断・治療に対応することは困難になってきており, 患者個人の遺伝子を精密に解析した個々の医療が注目されている。しかし, 遺伝子は個体の先天的な初期条件を決めているだけで, 後天的な生活習慣に対しては間接的な役割は認めるものの, 生活習慣に直接的に起因する個人別の生理活性や生理機能の識別を行うことは困難である。今後, 病は環境に対する個体の不適応の結果によって起こるものを中心となり, それが生活習慣病であると考えられる。疾患の発症や予後には, 遺伝的要因, 外部環境要因, 生活習慣要因が関与しており, なかでも生活習慣要因としては, 喫煙と肺がん, 肺気腫, 動物性脂肪の過剰と大腸がん, 食塩の過剰摂取と脳卒中, 肥満と糖尿病, 飲酒と肝硬変,

などが挙げられるが, 逆に生活習慣病は生活習慣を改善することにより疾病の発症や進行を予防できることを意味する。

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) は, 主として大腸粘膜を侵し, びらん (潰瘍の前段階) や潰瘍を形成するびまん性の原因不明の炎症である。日本の患者数は6万人を超え (2000年特定疾患医療受給者証交付件数), 近年では年間約4千人が発症しており現在も増加を続けている。世界的には欧米諸国を中心に, 北欧やアメリカの白人, ユダヤ人に特に多く, 世界の全患者数約55万人中32万人以上がアメリカにいとと言われる。現在, 治療法は薬物療法としてステロイド, 免疫抑制剤, 抗生物質などが使用されているが, 治療薬に大量のステロイドを使用することで骨がもろくなる大腿骨骨頭壊死や関節炎などが合併症となりやすい。多量の出血をし, 輸血でも間に合わない場合や, 巨大性結腸穿孔, もしくは癌化あるいは再発をくり返す場合には外科的処置が必要となる。そこで本研究では, UCを予防, あるいは治療できる食品成分を究明することを目的とした。

## 2. 実験方法

UCを抑制するための物質として, zerum-bone (ZER) と nimesulide (NIM) に着目した (図1)。ZER は, lipopolysaccharide (LPS) / IFN- $\gamma$  刺激マウスマクロファージ RAW 264.7 細胞系で inducible nitric oxide synthase (iNOS) や cyclooxygenase (COX)-2 の発現, nitric oxide (NO) や superoxide ( $O_2^-$ ) の産生,

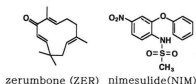


図1 ZERとNIMの化学構造

さらに prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> や tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の放出を抑制し、また分化させた<sup>1,2)</sup> HL-60細胞系では、がんの転移に関係する matrix metalloproteinase 活性を抑制する。これらはいずれも炎症や発がんに関連したバイオマーカーである<sup>3-8)</sup>。一方、NIMは選択的合成 COX-2 阻害剤であり、現在、臨床試験によってヒト大腸がんの予防効果が試されている期待薬剤である。

図2に示したように、まず1週間予備飼育したICRマウス雌7週齢を、さらに1週間基礎条件で飼育した後、基礎飼料と5%デキストラン硫酸塩 (DSS, 炎症惹起剤) 水道水を1週間投与する群 (DSS群)、基礎飼料の代わりに、それぞれ0.1% ZER (ZER群)、0.1% NIM (NIM群)、0.1% ZER+0.1% NIM (COM群) を含む飼料と5% DSS 水道水を投与する群に分け飼育した。また、コントロールとして基礎条件で2週間飼育する群 (CTL群) も設けた。上記の条件で2週間飼育し、飼育前後の体重変化を測定し

た。その後、頸椎脱臼法でと殺し、採取した大腸粘膜中の各種炎症関連パラメーター (ELISA 法により測定) と大腸長 (潰瘍性大腸炎では、大腸長の短縮が見られる) を測定し、さらに組織学的解析を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 摂餌量と摂水量

飼育中の水および餌は自由摂取とした。水は3日に一度新しいものと取り替え、また餌は毎日減少分を補充し、さらに3日に一度はすべて廃棄し新しいものと取り替えた。毎日、水および餌の減少量を測定し、1匹1日当たりの飲水量および摂食量を求めた。マウス1匹当たりの飲水量はCTL群では1日平均8.1gで期間中ほぼ一定量を示したが、他の群ではDSS投与3日目、ないし4日目から飲水量の減少が見られた。DSSを投与した4群の間には有意な差は認められず、餌に混合された各サンプルの効果を除けば、各群ともにほぼ同程度の潰瘍性大腸炎が誘導されと考えられる。

摂食量に関しては、CTL群では飼育期間中、1日1匹当たり平均5.4gでほぼ一定量を摂食しているのに対して、他の群ではDSS投与開始4日目から有意に減少した。DSS投与前の1週間

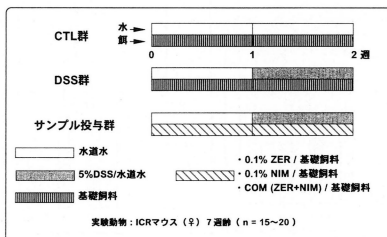


図2 DSS誘発マウス潰瘍性大腸炎誘発試験法

では、各サンプル投与群に摂食量の差は見られなかったことから、DSS 投与後の摂食量の減少は潰瘍性大腸炎が誘導されたことによる消化器官の機能低下および体力消耗によるものであると考えられる。最終日には有意差は認められないが、COM 群は、DSS 群と比べ摂食量の減少が緩和される傾向が見られた。

### 3.2 体重および大腸長の変化

体重は、サンプル投与開始時と DSS 投与開始時、そして解剖時の 3 回測定を行った。DSS 投与開始までの 1 週間では全群一様に 1.7g の体重増加が見られた。続く解剖までの 6 日間で CTL 群では 1.5g の体重増加が見られたが、他の群で

は DSS 投与後 6 日間で、一様に約 5.6g の体重減少が確認された。各サンプル投与による体重減少の緩和効果には差がなかった。

また潰瘍性大腸炎では、大腸長が減少することが知られている。図 3 に示すように DSS 群 (62.3mm) では、CTL 群 (80.6mm) と比べて 23% の有意な大腸の短縮が見られた。一方、COM 群 (69.9mm) では DSS 群と比べ大腸の短縮が 42% 有意に緩和された。

### 3.3 炎症性サイトカインの変化

と殺したマウスから大腸を摘出し、かみそりで採取した粘膜をリン酸バッファー中でホモジナイズした後、上清中の各種炎症性サイトカインのう

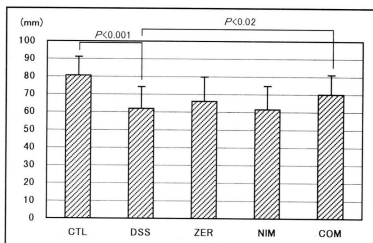


図 3 各群マウスの大腸長

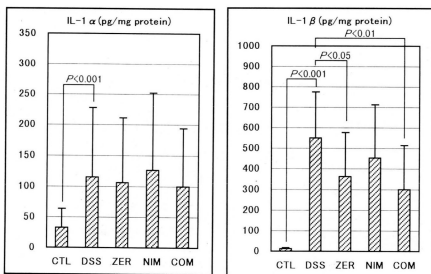


図 4 各群マウスの大腸粘膜中の IL-1α (左) および IL-1β (右) レベル

ち、IL-1 $\alpha$ 、-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で定量した。なお、ELISA による測定値はタンパク質量で補正した。

図4に IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の産生量を示した。IL-1 $\alpha$  に関しては DSS 群 (114.9pg/mg) で CTL 群 (32.4pg/mg) と比べ、3.5 倍の増加が見られたが、すべてのサンプル投与群で有意な抑制効果は認められなかった。

IL-1 $\beta$  に関しては DSS 群 (551.4pg/mg) で CTL 群 (11.0pg/mg) と比べ50倍の増加が見られた。各サンプル投与群に関しては、NIM 群 (453.0pg/mg) では若干の抑制傾向を示したのみであったが、ZER 群 (366.5pg/mg) で34%、COM 群 (298.4pg/mg) で47%それぞれ有意に抑制し、COM 群でもっとも強い抑制効果が見られた。

これまでの報告から、マウス潰瘍性大腸炎モデルでは、DSS 投与により大腸粘膜中の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の産生量が増強されると考えられる。しかしながら今回の実験では、DSS 群 (596.1pg/mg) では CTL 群 (1289.5 pg/mg) と比べて0.46倍に減少すると言う予想外の結果となった (図5)。また、ZER 群 (395.6

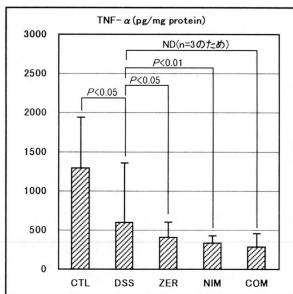


図5 各群マウスの大腸粘膜中の PGE<sub>2</sub> (左) および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (右) レベル

pg/mg)、NIM 群 (325.8pg/mg)、COM 群 (280.8pg/mg) に関しては DSS 群と比べて、TNF- $\alpha$  の産生量に有意な減少が見られた。DSS 群の TNF- $\alpha$  の産生量が CTL 群と比べ減少した原因については不明である。

### 3.4 PG 類の変化

炎症性メディエーターである PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の定量をサイトカインの時と同様に ELISA 法で行った。図6に PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の定量結果を示した。PGE<sub>2</sub> に関して、DSS 群

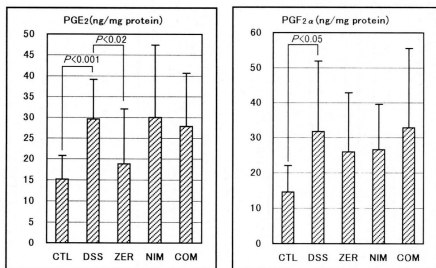


図6 各群マウスの大腸粘膜中の TNF- $\alpha$  レベル

(29.4ng/mg)はCTL群(14.8ng/mg)と比べて2.0倍に増加した。サンプル投与群では、ZER群(18.8ng/mg)がDSS群に対して72%の有意な抑制活性を示した。一方、COX-2選択的阻害剤であるNIM群では予想に反して有意な抑制効果が見られなかった。

PGF<sub>2α</sub>に関しては、DSS群(31.7ng/mg)ではCTL群(14.6 ng/mg)と比べて2.2倍となったが、ZER群(26.2ng/mg)とNIM群(26.7 ng/mg)では抑制傾向が見られるものの有意差はなくCOM群では効果が見られなかった。

COX-2選択的阻害剤であるNIMがPGsの抑制効果をほとんど示さなかった原因については、投与量、投与期間に問題があったのではないかと

考えるが、更なる解析が必要である。

### 3.5 組織学的解析

図7はCTL群とDSS群の大腸の組織写真である。DSS群ではCTL群と対照的に、粘膜の損傷や、潰瘍の前段階であるびらん、浮腫の形成が確認できる。これら大腸の組織標本写真について、びらん・潰瘍数、浮腫形成、粘膜再生変化の三つの炎症関連パラメーターをスコア化しまとめた(図8)。これらは、まだ解析匹数が少ない(n=5, 6)ため有意差はない。びらん潰瘍数はDSS群(13)に対し、ZER群(8.2)、NIM群(6.8)では減少が見られ、特にCOM群(5.8)で最も強い抑制効果が認められた。浮腫についてもDSS群(4)と比べてZER(2.4)、NIM群(2.6)で抑制効果が見られ、またCOM群(1.6)で最も強い抑制効果が見られた。粘膜の再生変化についてもDSS群(1.2)に対し、ZER群(2.8)、NIM群(2.8)が良いスコアを示し、COM群(3.6)で最も良好な再生変化が認められた。この三つのパラメーターを総合すると、組織学的評価ではCOM群がもっとも強い炎症抑制効果を持つと考えられる。

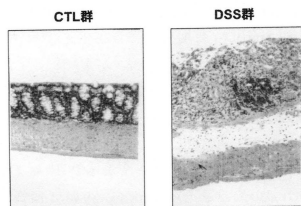


図7 CTL群(左)とDSS群(右)の大腸組織像

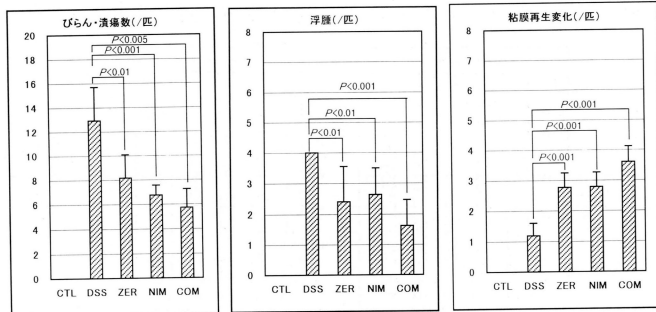


図8 各群マウスの組織学的解析結果(左:びらん・潰瘍数, 中:浮腫, 右:粘膜再生変化)

#### 4. 考 察

本研究では、大腸がんのハイリスクモデルの一つであるマウス潰瘍性大腸炎モデルにおいて、東南アジア産食用植物ニガシヨウガの主成分である ZER と COX-2 inhibitor である NIM の抑制効果を評価した。

ZER は、IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, 組織学的パラメーターを有意に抑制し、また作用機構の異なる NIM と組み合わせることにより、大腸長、IL-1 $\beta$ , 組織学的パラメーターに関して、それぞれ単独投与群よりも増強効果が認められた。

食用植物成分である ZER が *in vivo* 系で NIM と同等、あるいはそれ以上の炎症抑制効果を示した事実は、食品成分による疾病の化学予防効果の潜在能力を示唆するものである。また、本研究で示された ZER と NIM の組み合わせでの増強効果は相乗的であると考えられ、この効果は ZER が COX-2 の *de novo* 合成を阻害するのに対し、NIM は COX-2 活性を阻害するという両者が相異なる作用機序を持つためであると考えられる。

複数の物質を組み合わせた時の複合効果については、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生系である TPA 刺激分化 HL-60 細胞に対して、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生抑制活性を示す ACA と O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去活性を持つ superoxide dismutase を、あるいは NO 産生系である LPS/IFN- $\gamma$  刺激 RAW 264.7 細胞に対して、iNOS 誘導抑制物質である ZER と iNOS 活性阻害物質である N<sup>G</sup>-monomethyl-arginine acetate など、作用機序の異なる物質を組み合わせることにより、それぞれ単独投与時よりも効果が相乗的に高まるという報告があり、また、食品は多種多様な物質の混合物であるという観点からも非常に興味深い。

COX-2 inhibitor である NIM が PGs の産生を抑制しなかった原因については、投与濃度や投与期間などに再考の余地があり、さらなる研究が

必要である。また、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  が DSS 投与により減少したという結果はこれまでは報告されていないが、TNF- $\alpha$  が炎症性サイトカインの中で最も多くの機能を持ち、複雑な炎症過程の正と負、両方のフィードバックに関わってこれを制御しており、また急性炎症期では TNF- $\alpha$  を抑制すると炎症は悪化するが、慢性期に TNF- $\alpha$  を無効化すると炎症は抑制されるという報告もあるなど<sup>9)</sup>、TNF- $\alpha$  が炎症の時期によって異なる複雑な炎症制御機構を持つことと深い関係があると考えられる。DSS の投与濃度および投与期間、すなわち炎症時期に注目したメカニズムについてもさらなる研究が必要であると考えられる。

今後更に、この系における他の食品および食品成分、または抗炎症剤などの活性評価とともに、RT-PCR 法による COX-2 mRNA 発現の解析や、酸化ストレスのマーカーとなる 8-hydroxydeoxyguanosine の ELISA 法による定量など解析するパラメーターを増やし、複数の物質の組み合わせによる複合効果や投与物質の代謝を含めた抑制効果の発現メカニズムの解明などが期待される。

#### 5. おわりに

本研究では、用いる試験系によっては合成薬剤よりも食品成分の方が疾病予防効果が高いことを示すことができた。がん、糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病は食生活に主要因があると言われ、その予防策の確立は急務であると言える。今回の研究結果を踏まえ、さらに食品因子の可能性を探索して行きたい。

#### 文 献

- 1) Murakami, A., Takahashi, D., Kinoshita, T., Koshimizu, K., Kim, H.-W., Yoshihiro, A., Nakamura, Y., Jiwajinda, S., and Ohigashi, H. Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly sup-

- presses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the a,b-unsaturated carbonyl group is a prerequisite. *Carcinogenesis* 23, 3193 (2002).
- 2) Murakami, A., Takahashi, M., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H. Identification of zerumbone in *Zingiber zerumbet* Smith as a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1811 (1999).
- 3) Ohshima, H., and Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 305, 253 (1994).
- 4) Miwa, M., Stuehr, D. J., Marletta, M. A., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis*, 8, 955 (1987).
- 5) Yip-Schneider, M. T., Barnard, D. S., Billings, S. D., Cheng, L., Heilman, D. K., Lin, A., Marshall, S. J., Crowell, P. L., Marshall, M. S., and Sweeney, C. J. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 21, 139 (2000).
- 6) Ahn, B., Han, B. S., Kim, D. J., and Ohshima, H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis*, 20, 1337 (1999).
- 7) Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B., and Ohshima, H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 1068 (1999).
- 8) Foslien, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 30, 3 (2000).
- 9) Diarello CA, *FASEB J.*, 8, 1314 (1994).

## Prevention of inflammation-related diseases by food factors

Hajime Ohigashi and \*Akira Murakami

(Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University and \*Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University)

Gastrointestinal inflammation is related to the onset of certain life style-related diseases, including cancer. At present, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used as practical drugs in humans. Some undesired side effects, however, are known to occur in the gastrointestinal tracts such as ulceration. The present study, thus, attempted to discover and evaluate effective anti-inflammatory compounds occurring in food items. We have selected zerumbone (ZER), a sesquiterpenoid in the rhizomes of subtropical ginger (*Zingiber zerumbet* Smith), for testing its efficacy in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) in mice with the use of nimesulide (NIM), a selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor for activity-comparison. The mice are exposed to DSS at a concentration of 5 % in drinking water to inflame their large bowels, and fed with 1,000 ppm ZER, 1,000 ppm NIM, or 1,000 ppm ZER+1,000 ppm NIM (combination group: COM) for 2 weeks. As the results, ZER significantly suppressed formation of interleukin (IL)-1 $\beta$ , prostaglandin (PG) Es, ulceration, edema, and reproduction of mucus membrane in the colon. On the other hand, NIM reduced the level of IL-1 $\beta$ , but not PGE<sub>2</sub>, suggesting that the natural food chemical ZER has a higher potency for mitigating gastrointestinal inflammation. Interestingly, we observed the most potent suppressive effect in COM-group. That results may be reasonable because ZER and NIM have distinct mode of action mechanisms, i. e., ZER suppressed the *de novo* synthesis of COX-2 while NIM selectively inhibit its catalytic activity. Our results suggest that the potential of food factors for their use for regulating the onset of life style-related diseases with higher efficacy and lower toxicity.