

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501008

研究課題名(和文)経口栄養食品と健康食品素材の混合による炎症性腸疾患に対する修飾作用

研究課題名(英文)Effects of the mixture of an oral nutritional product and health food material on inflammatory bowel disease

研究代表者

千原 猛 (CHIHARA, Takeshi)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・講師

研究者番号：00217241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎患者数は、年間約8000人ずつ増加していると報告されている。潰瘍性大腸炎は大腸癌のリスクファクターのため、その予防・病状改善は大腸発がん予防につながると考えられる。我々はこれまでに経口栄養食品であるGFOと同等のグルタミン、水溶性ファイバー、オリゴ糖混合物がマウス潰瘍性大腸炎モデルで抑制効果を示し、それは粘膜保護作用が示唆されることを報告してきた。そこで今回は炎症性サイトカイン産生抑制の可能性がある健康食品素材、高温高压処理ニンニクとの混合で検討した。その結果、検討した濃度の混合で大腸長短縮抑制は認められたが相加作用は見られず、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Ulcerative colitis is an important risk factor for colon cancer. Therefore, its prevention and symptom improvement are key factors for decreasing colon cancer rates. We previously reported the effects of the oral administration of a three-component mixture (GFO) containing glutamine (G), soluble fiber (F), and oligosaccharide (O) with the same constituents of the oral nutritional product GFO in a dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mouse model, and indicated that the underlying mechanism involved colonic mucosal protection. We herein investigated the effects of the simultaneous administration of GFO and high temperature and pressure-treated garlic (GFO-H) as a health food material, which may inhibit the secretion of inflammatory cytokines. As a result, GFO-H prevented the length of the colon from being shortened; however, it did not show additive effects, indicating the necessity of examining methods to appropriately administer it.

研究分野：生化学

キーワード：デキストラン硫酸ナトリウム 潰瘍性大腸炎 GFO混合物 高温高压処理ニンニク

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の難治性疾患に指定されている炎症性腸疾患の1つである潰瘍性大腸炎は、主として粘膜に糜爛や潰瘍を形成する大腸の原因不明のびまん性非特異性炎症疾患である。特定疾患治療研究の対象疾患、56疾患の中で最も多い患者数である。消化器系疾患調査研究班により報告では、年間約8000人ずつ増加していると言われており、その発症病因の1つがライフスタイルの欧米化によると推測されている。炎症性腸疾患の病態は、何らかの遺伝的素因をもつ宿主で腸内細菌、食事などの環境因子に対して過剰・異常な免疫反応(免疫学的異常)が惹起されて腸管に炎症が生ずると考えられている。すなわち、炎症活動期に浸潤した炎症細胞からサイトカイン、ケモカインなどのメディエーターやフリーラジカルが放出されて粘膜障害を惹起する(長沼ら, 2008)。

「国民衛生の動向」によると死因の第1位はもちろん悪性新生物であり、その部位別における大腸癌脂肪者数は、男性は第3位、女性は第1位であり、年齢調整死亡率では近年横ばいと報告されている。しかし、炎症と発癌の見地から考えると、潰瘍性大腸炎が増加している限り大腸癌は増加することが予想できる。事実、串山(2010)は潰瘍性大腸炎の長期経過例では炎症を母地とした大腸癌(colitic cancer)が見られ、診断から10年で2%、20年で8%、30年で18%に大腸癌の合併が認められると報告している。このように潰瘍性大腸炎は大腸癌のリスクファクターであるため、その予防・病状改善は大腸発癌の予防につながると考えられる。また、潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌の発生はdysplasia-carcinoma sequenceと称され、通常の大腸癌とは異なる発生経路を持つと考えられている。その肉眼的形態、組織形態においても通常の大腸癌とは異なる特徴を持ち、初期病変でも平坦型が多く存在診断や範囲診断が困難な病変が多いと報告されている(藤井ら, 2011)。この点からもその予防・病状改善は特に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

連携研究者の東口らは栄養サポートチームを立ち上げ、侵襲期後の早期経口・経腸栄養療法、GFO療法を実践し、長期絶食による腸管粘膜の萎縮を防止するとともに、腸管由来の免疫能を促進することを報告している(2004)。GFO療法とは、G:グルタミン 9g/day、F:水溶性ファイバー 15g/day、O:オリゴ糖 7.5 g/dayを少量の水で溶解し、1日に3回に分けて経口あるいは経腸的に投与するものである。申請者らはこれまでにこのGFOを用い、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する修飾作用を検討してきた。その結果、GFO高用量の1日2回の経口投与によりこのマウス潰瘍性大腸炎モデルの特徴である大腸の萎縮

度を示す大腸長の短縮を抑制する結果を得た。その抑制作用は大腸粘膜保護作用によることが示唆された。そこで、申請者はGFOの粘膜保護作用に加え、炎症性サイトカインの抑制物質を組み合わせれば、潰瘍性大腸炎に対してより有効となるのではないかと考えた。Skybergら(2011)らは、リンゴポリフェノールがマウス潰瘍性大腸炎モデルにおいて、大腸粘膜の炎症性サイトカイン mRNA発現レベルを減少させることを報告している。申請者らはこれまでにニンニクの健康食品素材作製に取り組み、ニンニクをオートクレーブにて高温高圧処理すると、ポリフェノールが増量、抗酸化能が増強された高温高圧処理ニンニク(High Temperature-treated Garlic; HTPG)が作製でき、それはラット大腸前がん病変形成を抑制することも報告してきた。そこで申請者は、経口栄養食品であるGFOと健康食品素材であるHTPGを混合し、マウス潰瘍性大腸炎モデルで検討した。

## 3. 研究の方法

(1)HTPGのDSS誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する修飾作用

第1実験として、HTPGのDSS誘発マウス潰瘍性大腸炎への影響を、HTPGの含有濃度が異なる混餌を用いて次のように検討を行った。

7週齢C57BL/6Jマウス20匹を1群5匹の1~4群に分けた。1と2群には飼料として基礎飼料のAIN-93Gを与えた。3群には低用量のHTPG混餌食を、4群には高用量のHTPG混餌食を与えた。そして、飲水は1群には水、2~4群には2%DSS溶液を与え潰瘍性大腸炎を誘発した。実験開始6日後に全てのマウス麻酔下で心臓採血にて犠牲剖検した後、大腸を摘出し次の測定を行った。

体重測定(実験期間中毎日)

大腸長測定(回盲口~肛門)の測定

大腸肥厚度の検討

血液学的検査

赤血球数、白血球数を多項目自動血球計数装置K-4500〔シスメックス(株)〕を用いて計測した。

細胞増殖性マーカーの赤血球ポリアミン(Pu:プトレッシン、Spd:スペルミジン、Spm:スペルミン)測定

Gerbaut(1991)およびLöserら(1988)の方法を参照に、赤血球除タンパク液を作製した後に、HPLC-蛍光検出法にて分析を行った。

大腸粘膜 macrophage inflammatory protein-2(MIP-2)のmRNA発現レベル測定

採取した大腸粘膜を用い、High Pure RNA Isolationキットを用いてRNAを抽出する。RNA濃度を測定後に、トランスクリプターユニバーサルcDNAマスターを用いてcDNAを作製する。そのcDNAをTaqManプローブ法にてリアルタイムPCR反応により定量化し、 $\beta$ -アクチンを内部標準として標準化を行った。

(2) GF0 混合物と HTPG の混合による DSS 誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する修飾作用

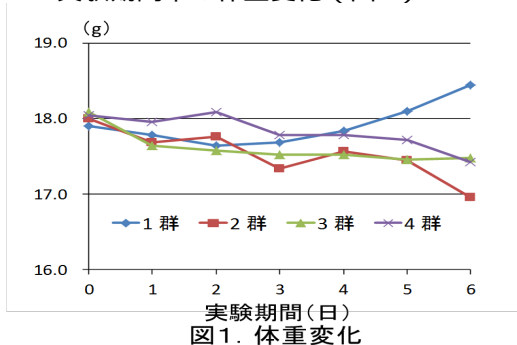
第2実験として、第1実験で抑制効果みられた低用量 HTPG 混餌を用い、GF0 混合物との混合による影響を次のように検討した。なお、GF0 は市販されているが、今後それぞれの単品での検討やそれらの配合比率の変化の検討も必要なが予測されるため、グルタミン、水溶性ファイバー、オリゴ糖を、それぞれ単品市販品を購入し市販 GF0 と同割合で混合したもの(GF0 混合物)を実験に使用した。C57BL/6J マウス 20 匹を 1 群 5 匹の 1~4 群に分けた。飼料は 1 と 2 群には基礎飼料の AIN-93G を与え、3 と 4 群には低用量 HTPG 混餌を与えた。そして、4 群には GF0 を 1 日 2 回(10 時、22 時)高用量濃度を経口投与した。なお、1~3 群には GF0 と同容量の水を 1 日 2 回同じように経口投与した。また、飲水は 1 群には水、2~4 群には 2% DSS 溶液を与え潰瘍性大腸炎を誘発した。また、今回 HTPG と GF0 混餌の最初の実験であるため、実験開始 5 日後に実験 1 と同様の方法で犠牲剖検した後、大腸を摘出し次ぎの測定を行った。

- 体重測定
- 大腸長測定(回盲口~肛門)の測定
- 大腸肥厚度の検討
- 採取した大腸粘膜重量測定

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 1

##### 実験期間中の体重変化(図 1)



体重変化については有意な変化は見られなかった。しかし、最終体重においては、2群が実験開始時に比べ 5.8%減少に対し、3群は 3.3%、4群は 3.4%の減少であった。

##### 大腸長の比較(図 2)

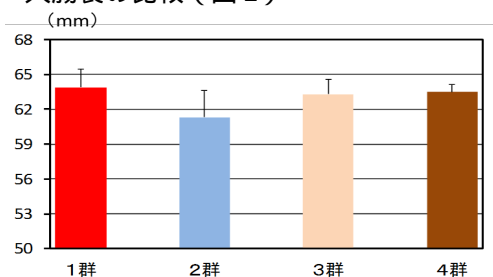


図2. 大腸長の比較

潰瘍性大腸炎モデルの特徴である大腸の萎縮度を示す大腸長の短縮について検討を行った。1群に対していずれの群も有意差は認められなかったが、3群および4群が2群よりも長く、短縮を抑制する傾向が見られた。

##### 大腸肥厚度の検討(図 3)

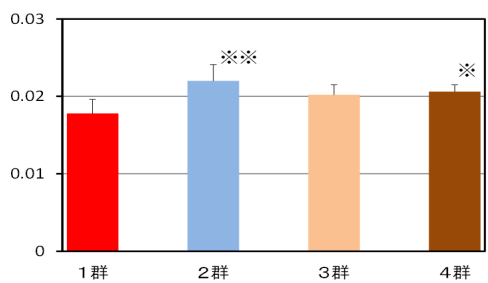


図3. 大腸重量(g/cm)の比較

※※p<0.01, ※p<0.05 vs. 1群 (Dunnett Multiple comparisons test)

本モデルのもう一つの特徴である大腸の肥厚度を大腸重量と大腸長の比で検討した。その結果、1群に対し 2群(p<0.01)と 4群(p<0.05)は有意に増加していたが、3群では有意な増加は見られなかった。

##### 血液学的検査

赤血球数は、1群に対し 2~4群はいずれも低値を示したが、有意差は認められなかった。一方、白血球数は 1群に対し、2群は 4.2 倍、3群は 2.5 倍、4群は 3.2 倍増加し、3群のみに有意差が認められたが、平均値による増加率は最も低値であった。

##### 赤血球ポリアミン測定結果(図 4)

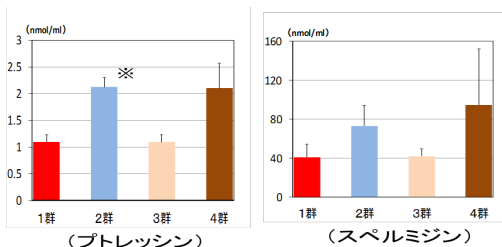


図4. 赤血球ポリアミン値

※p<0.05 vs. 1群 (Dunn's Multiple comparisons test)

赤血球ポリアミンの Pu、Spd、Spm とともに 2群と 4群は 1群に対して増加(Puのみ 2群のみに有意差が認められた)したのに対し、3群では増加は認められなかった。

##### 大腸粘膜 MIP-2 mRNA 発現レベル測定結果(図 5)

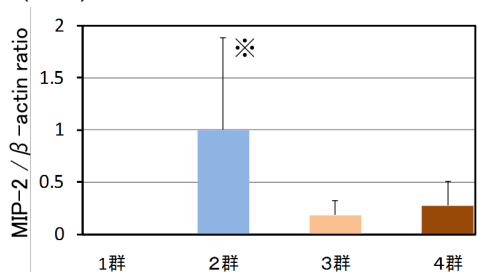


図5. 大腸粘膜 MIP-2 mRNA発現レベル

※p<0.05 vs. 1群 (Dunn's Multiple comparisons test)

炎症初期の好中球の遊走や浸潤に重要な役割を担っていると考えらえるケモカインのMIP-2のmRNA発現レベルは、2群が1群に対して有意( $p<0.05$ )に増加していたが、3群と4群では有意な増加はみられなかった。

これらの結果より、高用量 HTPG 混餌よりも低用量 HTPG 混餌が、マウス潰瘍性大腸炎モデルに有用である可能性が示唆された。

## (2) 実験2

### 実験期間中の体重変化

体重変化については有意な変化は見られなかった。最終体重においては、2群が実験開始時に比べ2.9%減少、3群は0%、4群は2.3%の減少であった。

大腸長の比較 (図6)

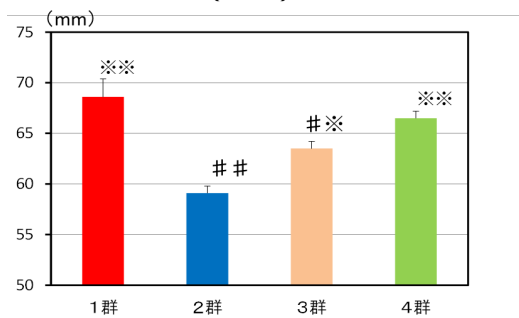


図6. 大腸長の比較

# #  $p<0.01$ , #  $p<0.05$  vs. 1群 (Dunnett Multiple comparisons test)  
 \*\*  $p<0.01$ , \*  $p<0.05$  vs. 2群 (Dunnett Multiple comparisons test)

今回の検討において、大腸長は1群に対して、2群 ( $p<0.01$ )、3群 ( $p<0.05$ )は有意に短縮していた。しかし、2群に対しては3群、4群が有意 (それぞれ  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) に長かった。

大腸肥厚度の検討 (図7)

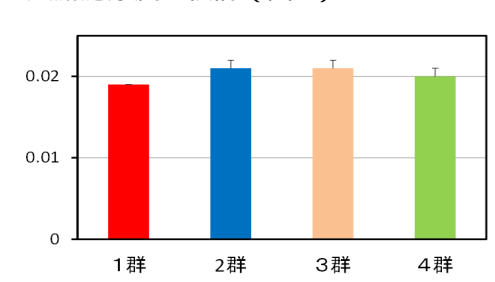


図7. 大腸重量 (g/cm) の比較

大腸肥厚度は有意な変化は見られなかったが、いずれの群も2群より重くなることはなかった。

大腸粘膜重量測定結果 (図8)

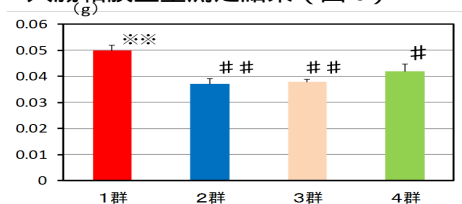


図8. 大腸粘膜重量の比較

# #  $p<0.01$ , #  $p<0.05$  vs. 1群 (Dunnett Multiple comparisons test)  
 \*\*  $p<0.01$  vs. 2群 (Dunnett Multiple comparisons test)

大腸重量測定後にスライドガラスにてスクレイプした粘膜重量を各群で比較してみた。1群に対し、2群、3群、4群とも有意に (それぞれ  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低重量であった。なお、2群に対して3群、4群とも有意な変化は見られなかった。しかしながら、4群は低重量ながらも2群、3群よりもp値が大きいことより、やはり粘膜保護作用を示す可能性が示唆された。

経口栄養食品と健康食品素材混合によるマウス潰瘍性大腸炎モデルに対する修飾作用を検討するにあたり、まず健康食品素材の検討として高温高圧処理ニンニクを検討した結果、低用量混餌で有用である可能性が示唆された。なお、オートクレーブ処理時間を短くしたニンニク用い少数例で予備的に検討を行ってみたが良好な結果は得られなかった。処理時間を短くするとポリフェノール含量や抗酸化能が減少することが影響しているのかもしれない。そこで、これまでの条件の高温高圧処理ニンニクとこれまで本モデルに対する有用性を報告してきたGFO混合物との混合で検討を行った。実験5日間での検討であったが、大腸長短縮抑制にはより有用である可能性が示唆された。しかしながら、採取粘膜重量を見てみると、DSSのみを与えた2群とに差はなく、両者の混合による相加作用は今回の混合条件では見られなかった。今後、実験期間を延長し経時的に観察を行い両者の混合による有用性を検討したい。また、GFO混合物の経口投与回数や高温高圧処理ニンニクの混餌濃度の検討を行い最適条件についても検討を実施していきたい。

## <引用文献>

長沼 誠、日比紀文、潰瘍性大腸炎、Crohn病の疫学、消化器外科、31巻、2008、1467-1475  
 串山義則、潰瘍性大腸炎、治療増刊号、92巻、2010、881-887

藤井茂彦、日下和広、藤盛孝博、大腸癌 Frontier、4巻、2011、24-30

Skyberg JA, Robison A et al. Apple polyphenols require Tcell to ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis and dampen proinflammatory cytokine expression, Journal of Leukocyte Biology. Vol90, 2011,1043-1053.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takeshi Chihara, Kan Shimo, Takaaki Kaneko, Akiko Tomatsu, Hidehiko Beppu, Takashi Higashiguchi, Shigeru Sonoda.

The effect of preparatory conditions of high temperature- and pressure-treated garlic on 5-hydroxymethyl-2-furfural and

S-allylcysteine formation.  
Journal of Analytical Bio-Science. 査読  
有. 36. 2013.186-192.

〔学会発表〕(計 1 件)

千原 猛、新保 寛、金児孝晃、戸松亜希子、  
別府秀彦、園田 茂、東口高志. 高温高压処  
理ニンニクのがん予防食品を目指した作製  
条件の再検討. 第7回日本臨床検査学教育学  
会学術大会. 2012年8月23日. 名古屋国際  
会議場(名古屋).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

千原 猛 (CHIHARA, Takeshi)  
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・  
講師  
研究者番号：00217241

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

東口 高志 (HIGASHIGUCHI, Takashi)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：40198974  
伊藤 彰博 (ITO, Akihiro)  
藤田保健衛生大学・医学部・准教授  
研究者番号：50273355  
新保 寛 (SHIMPO, Hiroshi)  
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・  
教授  
研究者番号：10142580