

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07453

研究課題名(和文) 生薬の修治 - 蜜炙法による免疫賦活作用発現の分子機構の解明

研究課題名(英文) Processing of crude drugs - The mechanism of the appearance of immunostimulatory activity by heating with honey

研究代表者

太田 美里 (Ota, Misato)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・研究員

研究者番号：00767121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生薬を蜂蜜と共に加熱する加工(蜜炙)に注目し、科学的エビデンスを得ることを目的とした。培養マウス消化管上皮細胞(MCE301細胞)に各種蜂蜜または含有する糖類の加熱処理品の熱水抽出エキスを添加し、培地中に放出されるG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) 濃度をELISA法により測定した。蜂蜜の加熱によりG-CSF産生誘導活性が発現し、isomaltoseが本活性に寄与していた。180℃では1時間、200℃では15～30分加熱した時、活性が最大であった。以上、isomaltose含量の高い蜂蜜が蜜炙に適していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では蜂蜜を加熱するだけで、免疫賦活作用が得られることを発見し、それを担う含有成分としてisomaltoseを得た。本研究結果から、バラツキの大きい蜂蜜市場品の品質を評価するときの指標としてisomaltose含量が提案でき、商品の差別化に応用できる内容である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to obtain the scientific evidence on the processing process of roasting crude drugs with honey (honey-roasting). Various honey market products and various sugars contained in honey were used as experimental materials, which were heated under various conditions. Murine gastrointestinal epithelial cells (MCE301 cells) were cultured with these samples, and the concentration of G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) released into the medium was measured by the ELISA. Inducible activity of G-CSF production was appeared in various honey samples by heat processing. From the correlation between the content of sugars and the activity, it was discovered that isomaltose contributes to this activity, and the maximum conditions were 180 °C for 1 hour and 200 °C for 15 to 30 minutes. Isomaltose contributed to the induction of G-CSF production in heated honey, and it is suggested that honey with a high isomaltose content is suitable for honey roasting.

研究分野：生薬学、薬用植物学

キーワード：蜂蜜 イソマルトース 顆粒球コロニー刺激因子 腸管免疫 トール様受容体

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは、日本で使用される漢方製剤の7割以上に配合されている「甘草」に注目して、修治の目的とその科学的意義についての研究を行ってきた。中国では、甘草の薬効を高めるために古代から蜂蜜とともに加熱（以下、「蜜炙」と称する）した「蜜炙甘草」を用いてきた。日本でも甘草を単に加熱した「炙甘草」が日本薬局方に収載されているが、使用頻度はまだ多くはない。そこで、漢方医学の古典をひも解き、甘草の加熱処理の主たる目的がからだを温める作用を強めて補脾・補気作用を高めることと考察した結果、その作用は蜜炙により強くなると考えられた。漢方医学での補気・補脾作用は、現代科学では免疫賦活作用と翻訳でき、蜜炙は甘草の免疫賦活作用向上に有効であると考えた。

2. 研究の目的

生薬を加工（修治）して用いると薬効が向上するとされるが、科学的根拠に乏しい。本研究では、生薬を蜂蜜と共に加熱する加工法である蜜炙に注目して、蜜炙により免疫賦活作用が向上することを科学的に検証し、臨床応用に利用できるエビデンスを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

各種蜂蜜市場品、果糖ブドウ糖液糖、蜂蜜に含有する各種糖類を単独または混合したものを実験材料とした。また、加熱前の蜂蜜市場品に含まれる各種糖類の含量を HPLC で測定した。培養マウス消化管上皮細胞（MCE301 細胞）にこれらのサンプルを添加し、培地中に放出される G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) の濃度を ELISA 法により測定した。また、細胞毒性を検討するため、MTT アッセイを行った。さらに、細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR 分析により細胞内の G-CSF mRNA の発現レベルを評価した。また、G-CSF 産生誘導作用の発現メカニズムを解明するため、sparstolonin B (Toll 様受容体、TLR2/4 の阻害剤) または resatorvid (TAK-242、TLR4 の阻害剤) と共培養し、ELISA によりその G-CSF 産生誘導活性に対する阻害作用を検討した。

4. 研究成果

各種蜂蜜は、加熱加工により G-CSF 産生誘導活性が発現し、概ね中国市場品は日本市場品に比して強い活性が認められた (**Figure 1 A**)。各種蜂蜜中の糖類含量と活性との相関を検討したところ、最も高い相関関係が見られた turanose は加熱しても活性が発現しなかったが、二番目に高い相関関係を示した isomaltose は加熱により活性が発現した (**Figure 1 B-E**、**2 A**)。

蜂蜜中の各種糖類含量をもとに糖類を混合したサンプルを調製し、そこから isomaltose を除いたサンプルと比較したところ、isomaltose を除くことで活性が発現しなかった (**Figure 2B**)。また、加熱処理イソマルトースは、濃度依存的な G-CSF 産生誘導活性を示した (**Figure 2C**)。

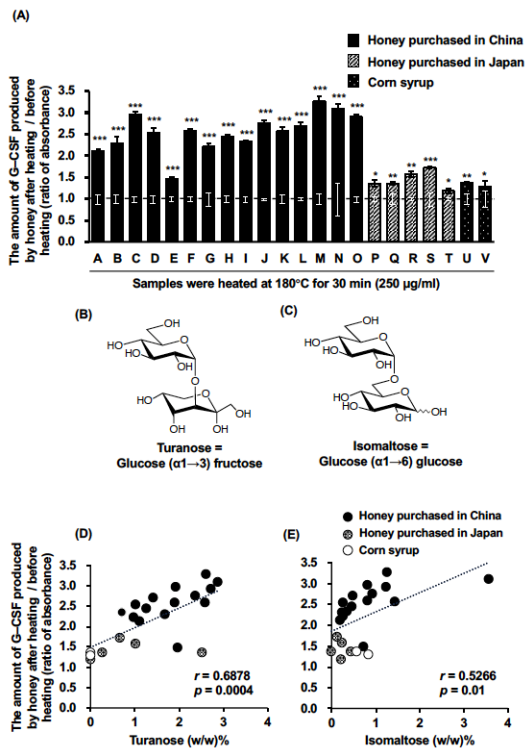


Figure 1. Differences in the inducible effect of honey and its related products, purchased in China and Japan, on G-CSF secretion in MCE301 cells. (A) Each sample was either heated to 180 °C for 30 min or unheated, then dissolved in a medium at 250 µg/ml. Cells were incubated for 24 h and the G-CSF levels in the medium were measured by ELISA. Data are shown as the ratio of the heated sample absorbance and that of the unheated sample. The letters shown on X-axis indicates the sample codes shown in Table 1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between the unheated honey group and the heated honey group shown with the same letters for Student's *t*-test. Data are represented as the mean \pm S.E. ($n = 3$). (B, C) The structures of turanose and isomaltose, respectively. (D, E) Scatter plot between the inducible effects on the G-CSF secretion in MCE301 cells and the amounts of turanose and isomaltose in the honey samples. The correlation coefficient was calculated using the Pearson correlation analysis and regression analyses. The Y-axis shows the increased activity (a). $0.4 < r < 0.7$ indicates a positive correlation between the two groups of data.

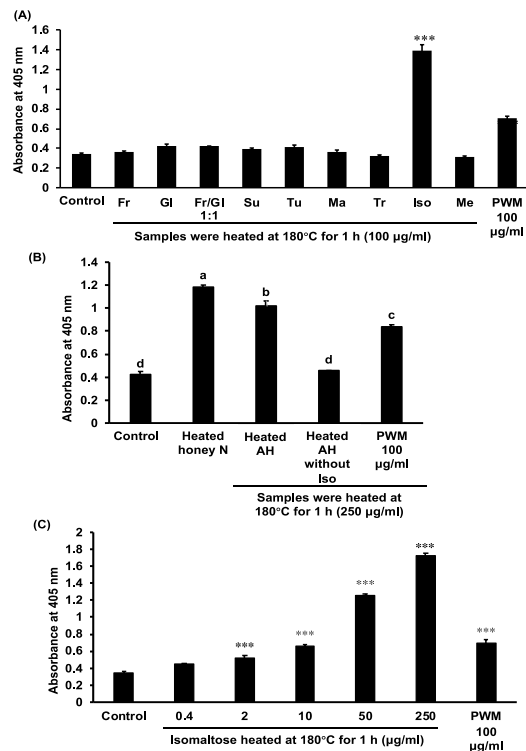


Figure 2. Inducible effect of each sugar or heated artificial honey (AH) heated on the G-CSF secretion in MCE301 cells. (A) Each sugar or the mixture of glucose and fructose (1:1), (B) AH with or without isomaltose, or (C) isomaltose was heated at 180 °C for 1 h. (B) AH with or without isomaltose was prepared according to the ratio of sugar contents in honey sample N and the contents of sugars in AH with or without isomaltose shown in Supplementary Table 1. After being heated, the samples were dissolved in the medium, and the cells were incubated for 24 h. The G-CSF levels in the medium were measured by ELISA and the data are shown as the absorbance. (A, C) *** $p < 0.001$ against the control group by Dunnett's multiple *t*-test. (B) The different letters over the columns indicate significant treatment differences as determined by Dunn's multiple *t*-test ($p < 0.05$). Data are represented as the mean \pm S.E. ($n = 6$). Fr: fructose; Gl: glucose; Su: sucrose; Tu: sucrose; Ma: maltose; Tr: trehalose; Iso: isomaltose; Me: melezitose; PWM: pokeweed mitogen.

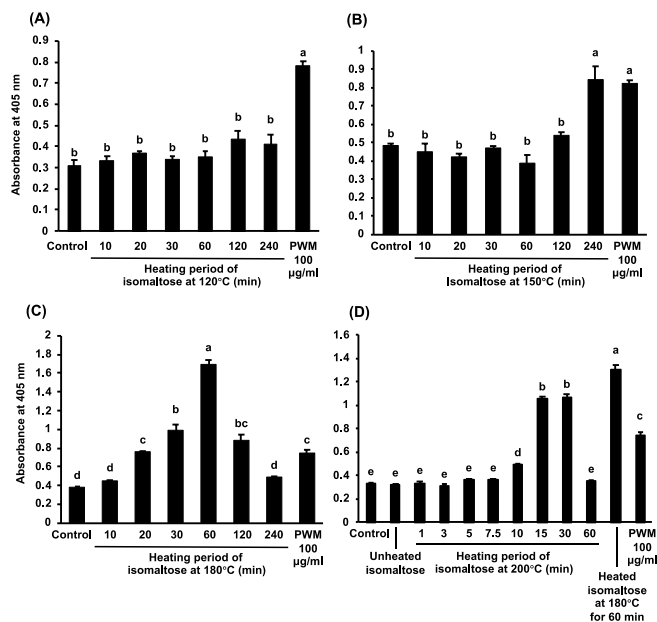


Figure 3. Inducible effect of isomaltose heated at various conditions on the G-CSF secretion in MCE301 cells. After being heated, the samples were dissolved in the medium at 250 µg/ml, and the cells were incubated for 24 h. The G-CSF levels in the medium were measured by ELISA and the data were shown as the absorbance. The different letters over the columns indicate significant treatment differences as determined by Dunn's multiple *t*-test ($p < 0.05$). Data are represented as the mean \pm S.E. ($n = 3$ for (A-C); $n = 5$ for (D)). PWM: pokeweed mitogen.

Isomaltose は 180°C で 1 時間の加熱加工条件において最も強い活性発現を示し、200°C では 15~30 分の条件が最大であった (Figure 3)。また、加熱 isomaltose 添加後 1 時間において MCE301 細胞における G-CSF mRNA の発現レベルは亢進した。

また、加熱 isomaltose を分子量 1 万でカットオフする透析膜で透析した結果、その活性成分は高分子画分に移行し、サイズ排除クロマトグラフィーにより、isomaltose の加熱加工産物に含まれる活性成分は平均分子量 79 万の高分子であることが明らかになった (Figure 4)。さらにそれをトリクロロ酢酸を用いて加水分解したところ、glucose のみが加水分解産物として得られた。

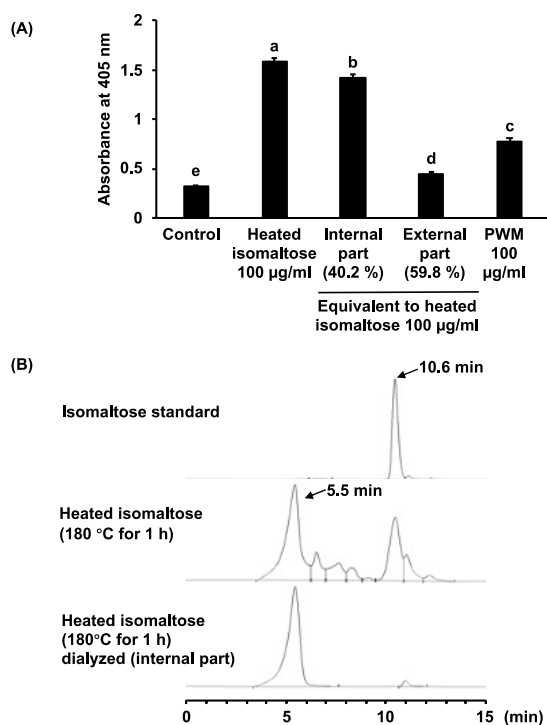


Figure 4. Prediction of the chemical structure of heated isomaltose. (A) Isomaltose was heated at 180°C for 1 h, then partitioned by a dialysis membrane with a molecular weight cutoff value of 12,000–14,000. The samples were dissolved in the medium at an equivalent concentration to the heated isomaltose (100 µg/ml) and the cells were incubated in it for 24 h. The G-CSF levels in the medium were measured by ELISA and the data were shown as the absorbance. The different letters over the columns indicate significant treatment differences as determined by Dunn's multiple *t*-test ($p < 0.05$). Data are represented as the mean \pm S.E. ($n = 6$). (B) HPLC chromatogram of isomaltose, heated isomaltose, and its high molecular weight fraction using size exclusion liquid chromatography. HPLC conditions: column, Inertsil WP300 Diol column (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 µm, GL sciences, Tokyo, Japan); mobile phase, water, 0.3 ml/min; column temperature, 40°C; injected volume, 10 µl; detector, refractive index detector RID-20A (Shimadzu). PWM: pokeweed mitogen.

加熱 isomaltose による G-CSF 産生に対する活性の増強は、TLR2 および TLR4 の両方のアンタゴニストである sparstolonin B によって有意に阻害された。さらに、MCE301 細胞を TLR4 の阻害剤である TAK-242 と共培養することで、活性が部分的に低下し、阻害作用は sparstolonin B よりも弱かった (Figure 5)。これらの結果から、加熱 isomaltose が G-CSF 産生の誘導作用は TLR2 と TLR4 の両方のシグナル経路を刺激することによって強く示唆された。

以上、isomaltose は加熱加工により重合し、TLR2 および 4 を刺激する高分子が得られることが明らかになった。蜂蜜の加熱による G-CSF 産生誘導作用の発現には isomaltose が寄与し、isomaltose 含量の高い蜂蜜が蜜炙に適していることが示唆された。

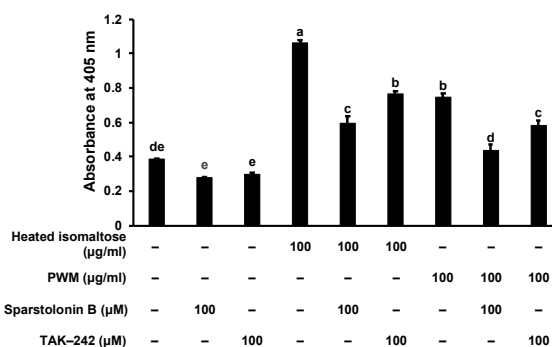


Figure 5. Counteractive effects of sparstolonin B or resatorvid (TAK-242) on the inducible effects of heated isomaltose (180°C for 1 h) on the G-CSF secretion in MCE301 cells. Cells were pretreated with sparstolonin B or TAK-242 for 2 h, then co-incubated with heated isomaltose or PWM for 1 h. The G-CSF levels in the medium were measured by ELISA and the data were shown as the absorbance. The different letters over the columns indicate significant treatment differences as determined by Dunn's multiple *t*-test ($p < 0.05$). Data are represented as the mean \pm S.E. ($n = 5$). PWM: pokeweed mitogen.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ota Misato, Ishiuchi Kan' ichiro, Xu Xin, Minami Masaaki, Nagachi Yasutaka, Yagi-Utsumi Maho, Tabuchi Yoshiaki, Cai Shao-Qing, Makino Toshiaki	4. 巻 228
2. 論文標題 The immunostimulatory effects and chemical characteristics of heated honey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 11~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jep.2018.09.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Xu Xin, Asai Koshi, Kato Daiki, Ishiuchi Kan' ichiro, Ding Kewen, Tabuchi Yoshiaki, Ota Misato, Makino Toshiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Honey isomaltose contributes to the induction of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) secretion in the intestinal epithelial cells following honey heating	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71993-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 許 キン、太田 美里、加藤 大貴、田淵 圭章、牧野 利明
2. 発表標題 G-CSF産生誘導活性を指標とした蜜炙法に適したハチミツの探索とその寄与成分
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 許金、太田美里、田淵圭章、牧野利明
2. 発表標題 G-CSF産生誘導活性を指標とした蜜炙法に適したハチミツの探索
3. 学会等名 天然薬物研究方法論アカデミー第21回研究集会（蒲郡シンポジウム）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xin Xu, Misato Ota, Yoshiaki Tabuchi, Shao-Qing Cai, Toshiaki Makino
2. 発表標題 Mechanisms of honey-processing (蜜炙) in traditional Chinese medicine: Its inducible effects on G-CSF secretion from cultured intestinal cells
3. 学会等名 The 19th International Congress of Oriental Medicine (台北) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xin Xu, Misato Ota, Yoshiaki Tabuchi, Shao-Qing Cai, Toshiaki Makino
2. 発表標題 Inducible effect of heated honey on G-CSF secretion from cultured intestinal cells and its active ingredients
3. 学会等名 Nagoya Immunology Network in NCU (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫賦活活性組成物、免疫賦活活性剤、イソマルトース加熱産物の製造方法、及び経口摂取素材の免疫賦活活性評価方法	発明者 太田美里、牧野利明、許金、加藤大貴、田淵圭章	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-229435	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牧野 利明 (Makino Toshiaki) (80326561)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------