

Salacia reticulata のマウス腸管免疫系に対する影響

芳野 恭士*¹、間部 涼祐¹、宮本 潤基¹、原 悠樹¹、新井 康介¹、
榊山 達也¹、金高 隆²、古賀 邦正³

¹沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

²株式会社盛光 (〒411-0931 静岡県駿東郡長泉町東野 50-6)

³東海大学 開発工学部 (〒410-0395 沼津市西野 317)

*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

Effects of *Salacia reticulata* on the Intestinal Immune System of Mice

Kyoji YOSHINO, Ryosuke MANABE, Junki MIYAMOTO, Yuki HARA, Kohsuke ARAI,
Tatsuya SAKAKIYAMA, Takashi KANETAKA, Kunimasa KOGA

¹Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

²Seiko Co., Ltd (50-6 Higashino, Nagaizumi, Shizuoka 411-0931, Japan)

³Tokai University (317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-0395, Japan)

(Received January 16, 2014; Accepted February 17, 2014)

Abstract

In this study, the effects of the stems and leaves of *Salacia reticulata* on the intestinal immune system of mice were investigated. Oral administration of the stems and leaves of *S. reticulata* to mice for 28 days suppressed the levels of some cytokines such as interleukin-4 (IL-4) and IL-13, and some antibodies such as immunoglobulin E (IgE) and IgG, in the intestines, spleens, and/or sera of the mice. The intestinal levels of IL-5 were decreased, but the levels of IgA were increased due to elevated levels of IL-6 and IL-10. In the intestines and sera, the levels of IL-12 and interferon- γ (IFN- γ) were increased, and the levels of lipid peroxide and IL-17 were decreased. These results suggest that the administration of the stems and leaves of *S. reticulata* to mice prompted some immunoregulatory functions in the intestinal and systemic immune systems, such as the suppression of humoral immune responses, the modulation of immune responses by Treg cells, the induction of IgA by activation of the cellular immune response, the suppression of oxidative stress and inflammation, and the suppression of specific inflammatory systems induced by IL-17. In addition, the administration of the leaves of *S. reticulata* resulted in an increased amount of lactic acid bacteria in the feces of the mice.

Keywords: *Salacia reticulata*, intestinal immune system, cytokine, antibody

1. 緒言

サラシア属植物は、インドやスリランカなどで古くから天然薬物として利用されてきた Hippocrateaceae 科のつる性の植物である。インド、

スリランカの伝統医学であるアーユルヴェーダにも記載されているハーブの一つであり、その根あるいは幹は、主に糖尿病の初期治療等に効果があることが知られている[1,2]。

ところで、サラシア属植物の服用により体感する効果の一つに、便性の改善がある[3]。便が形成される腸管には、細菌叢があり、また、体内免疫系全体の 60~70%の細胞や抗体から構成されている主要な免疫システムがある。腸管免疫系は、自然免疫系と獲得免疫系に分けられる。獲得免疫系としては、ウイルス感染細胞等を抗原として認識する細胞性免疫応答と細菌等を抗原として認識する体液性抗体応答がある。腸管内の細菌や食物などの抗原は、腸管リンパ組織であるパイエル板に存在する M 細胞によって取り込まれ、その下部に存在する樹状細胞に認識される。樹状細胞は、抗原提示細胞として働くとともに、認識した抗原の種類によりインターリューキン-12 (IL-12) と呼ばれるサイトカインまたはプロスタグランジン E₂ (PGE₂) と呼ばれるケミカルメディエーターを産生して、1 型ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) または Th2 細胞の分化を促し活性化することで、細胞性免疫応答か体液性抗体応答を誘起する。腸管以外では、マクロファージ (Mφ) が抗原提示細胞として機能している。腸管において獲得免疫系に関わ

る主な免疫細胞とそのサイトカイン類、抗体類についての概要を Fig. 1 に示す。

我々はこれまでに、スリランカ産のサラシア属植物で、現地でコタラヒムブツと呼ばれている *Salacia reticulata* の幹や葉に、マウスの I 型や IV 型のアレルギー症状およびその関連サイトカインの増加を抑制する効果があることを報告してきた[4,5]。このことは、*S. reticulata* が動物の免疫系に影響を及ぼすことを示唆している。そこで本研究では、腸管の獲得免疫系に対する *S. reticulata* の影響について検討を行った。

2. 実験

2. 1 試薬および試料

スリランカ産 *S. reticulata* の幹および葉の乾燥物は、盛光社より供与されたものを、フードミルを使って微粉碎して用いた。ガラクトオリゴ糖としては、オリゴメイト 55NP (ヤクルト本社製、牛乳由来、純度 55%以上) を用いた。日本クレア社製のマウス飼育繁殖用標準粉末飼料 CE-2 に、*S. reticulata* の幹および葉の微粉碎物を 0.5% (w/w)

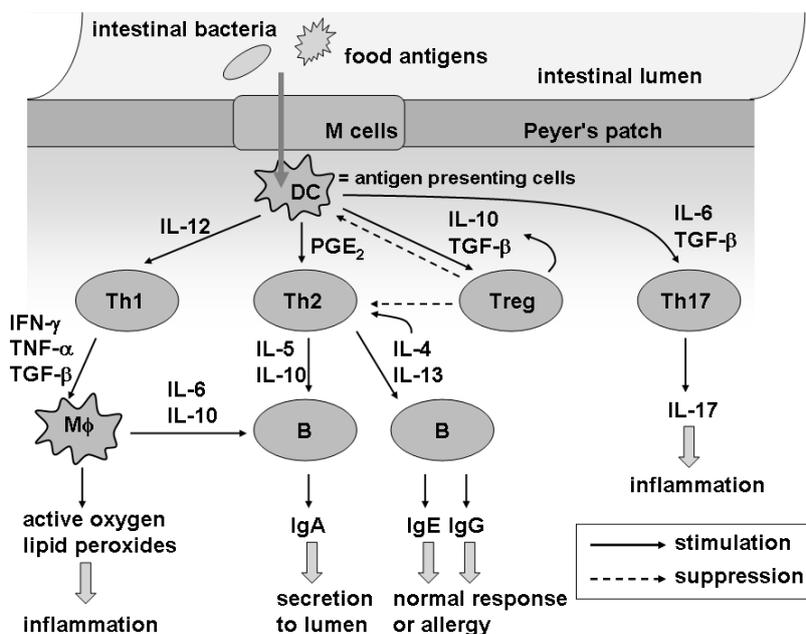


Fig. 1 Summary of acquired immunity system in mouse intestinal tract DC; dendritic cells, Th1; type 1 helper T cells, Th2; type 2 helper T cells, Th17; type17 helper T cells, Treg; regulatory T cells, B; B cells.

または 1.0% (w/w)、ガラクトオリゴ糖を 0.5% (w/w)となるように添加した飼料を、それぞれ調製した。

2. 2 実験動物

本実験には、日本 SLC 社より購入した 3 週齢の雄性 ddY 系マウスを用いた。マウスは、12 時間間隔で照明が点灯・消灯する 25°C の部屋で飼育し、実験中は水道水と調製した飼料を自由に摂取させた。実験の全期間を通じて、実験動物の取り扱い、「沼津工業高等専門学校における動物実験に関する指針」の規定に従った。

2. 3 マウスへの乳酸菌の前投与

一般に、ヒトの乳酸菌では *Bifidobacterium* 属が多いのに対し、マウスでは *Lactobacillus* 属が多いとされる[6,7]。そこで、マウスの腸内菌をヒトのそれに近づける試みを行った。

マウス 1 匹につき、2 種類の市販のプレーンヨーグルトとして、ビヒダス プレーンヨーグルト (BB536, 森永乳業社製, *Bifidobacterium longum* BB536 20 億個以上/100 g) およびソフル プレーン (ヤクルト本社製, *Lactobacillus casei* YIT 9029 10 億個以上/100 mL) のそれぞれ 0.25 mL を混合したものを、1 日 1 回経口投与する操作を 3 日間行った。この期間は、飼料として CE-2 を自由に摂取させた。

2. 4 *S. reticulata* のマウスへの投与と免疫系の評価

乳酸菌を前投与したマウスに対し、0.5%または 1.0%*S. reticulata* 幹添加飼料, 0.5%または 1.0%*S. reticulata* 葉添加飼料, 0.5%ガラクトオリゴ糖添加飼料, 何も添加していない CE-2 飼料をそれぞれ自由摂取させて、28 日間飼育した。CE-2 飼料摂取群を対照群とした。各群のマウスの匹数は 5 とした。

飼育中はマウスの飼料摂取量および体重を測定し、飼育終了後、エーテル麻酔下でマウスの小腸 (十二指腸を含む小腸上部約 15 cm) と心臓血、

脾臓を採取した。血液は 4°C、4,800 rpm で 15 分間遠心分離を行い、上清の血清を得た。腸管および脾臓は、生理食塩水で洗浄後、0.04M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いてそれぞれ 0.5%および 1.0% ホモジネートとしたものを、血液と同じ条件で遠心分離しその上清を得た。それぞれの試料について、サイトカイン類として IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, インターフェロン- γ (IFN- γ) のレベルを、また、抗体類としてイムノグロブリン A (IgA), IgE, IgG のレベルを、それぞれ市販の酵素免疫測定法 (ELISA) のキットを用いて測定した。脾臓については、一部の項目のみ測定を行った。さらに、血清と小腸は、その過酸化脂質レベルをチオバルビツール酸 (TBA) 法[8,9]で測定した。小腸の各測定値は小腸での免疫環境等を確認するために、また、血清と脾臓の各測定値は主に全身的な免疫環境等を確認するために使用した。

2. 5 マウス糞中に含まれる細菌の測定

2 種類のヨーグルトの等量混合物をマウスに 1 日投与し、その後、1.0%*S. reticulata* 幹添加飼料, 1.0%*S. reticulata* 葉添加飼料, 0.5%ガラクトオリゴ糖添加飼料, 何も添加しない飼料をそれぞれ与えて、7 日間飼育した。マウスは、1 群 3 匹を用いた。また、ヨーグルトを前投与せず、通常の飼料で飼育した群を健常群とした。飼育後、各群のマウスの糞を嫌気培養用容器に採取し、それぞれ約 0.1 g に 9 倍容の蒸留水を加えてバイオマッシャー II (ニッピ社製) でホモジナイズし、乳酸菌測定用 MRS 培地 (de Man, Rogosa, Sharpe; 3M 社製) で 1000 倍に希釈した。これをペトリフィルム生菌数測定用 AC プレート (3M 社製) 上で、35°C で 48 時間培養した後、コロニーを計数した。

これとは別に、2.3 および 2.4 の項の実験の際に、ヨーグルトを投与しないマウスの群を用意し、その後通常の飼料で 28 日間飼育した。他の群も含め、飼育終了時にマウスの糞を嫌気培養用容器

に採取し、その中に含まれる細菌の DNA を抽出し、16S rDNA の V3 領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) -変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いて分析した。

2. 6 統計処理

実験データは、平均値±標準誤差で表した。各群間の平均値の差の検定には、パラメトリック法であるステューデントの t-検定を用い、 $P<0.05$ を統計学的に有意であるとした。

3. 結果および考察

3. 1 マウスの体液性抗体応答に対する *S. reticulata* の影響

食物繊維やオリゴ糖は、プレバイオティクスとして乳酸菌など腸内細菌の増殖を促進して腸内環境を改善するとともに[10]、腸管免疫系を活性化するものと考えられている[11]。今回用いた *S. reticulata* の幹および葉には、食物繊維がそれぞれ 76.3 および 45.4 g/100 g 含まれており[12]、食物繊維の含量が多い素材の一つである。また、その α -グルコシダーゼ活性阻害作用のために、腸管内で吸収されなかった糖質が腸下部の細菌により資化される可能性がある。従って、*S. reticulata* はプレバイオティクスとしての機能を発揮する可能性がある。そのため、本研究では陽性対照として、通常マウスの腸管 IgA レベルを高めるとともに、卵白アルブミンに対するアレルギーを起こさせたマウスで血液または脾臓中の IL-4、IgE および IgG1 レベルを低下させる効果が報告されているガラクトオリゴ糖を用いることにした[13]。

S. reticulata の幹または葉、ガラクトオリゴ糖を摂取した場合の、マウスの飼料摂取量、体重増加量および免疫系等に対する影響に関する全測定結果を Table 1 に示す。

飼料摂取量と体重増加量については、28 日間の飼育中、*S. reticulata* の幹または葉の摂取群の一部で、対照群に比較して上昇する傾向が見られた。

ガラクトオリゴ糖の摂取群では、対照群と差は見られなかった。

体液性抗体応答において、IgE や IgG を産生する B 細胞を活性化する Th2 細胞関連サイトカインの IL-4 と IL-13 については、対照群に比較して、*S. reticulata* の幹摂取群の腸管で IL-4 レベルの低下、IL-13 レベルの上昇傾向が見られ、特に腸管の IL-4 レベルの低下は有意であった。血清では IL-13 レベルの上昇傾向は見られたが、IL-4 レベルには変動は見られなかった。*S. reticulata* の葉摂取群では、対照群に比較して腸管、血清ともに、IL-4 と IL-13 のレベルの低下傾向が見られた。ガラクトオリゴ糖摂取群では、対照群に比較して、腸管での IL-4 レベルは変動がなく、IL-13 レベルは低下傾向が見られた。血清では IL-4 と IL-13 のレベルの低下傾向が見られた。ガラクトオリゴ糖の場合、腸管では抗体を産生する能力を維持しながらも、全身で抗体の産生能を抑制して免疫寛容を誘発する、いわゆるプレバイオティクスとしての典型的な効果が見られたものと考えられる。一方で、*S. reticulata* の幹と葉の摂取群では、腸管、血清ともに Th2 細胞関連サイトカインのレベルを低下させる傾向があった。

このときの腸管、脾臓および血清の IgE あるいは IgG のレベルは、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取群において、*S. reticulata* の幹摂取群の腸管と脾臓の IgG およびガラクトオリゴ糖摂取群の腸管 IgE を除き、対照群に比較して低下傾向が見られた。特に、腸管と脾臓の IgG レベルの低下は、ガラクトオリゴ糖の摂取群で有意であった。

IgA を産生する B 細胞の活性化に関わるサイトカインのうち IL-5 のレベルは、腸管と血清のいずれにおいても、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖摂取群で、対照群に比較して低下傾向が見られた。脾臓の IL-5 レベルでも、

Table 1 Effects of the oral administrations of the stems and the leaves of *Salacia reticulata* on mouse food intake, weight gain, cytokine levels and antibody levels, and lipid peroxide levels in the intestines, sera, and/or spleens.

	Control		0.5% <i>S. reticulata</i> stem		1.0% <i>S. reticulata</i> stem		0.5% <i>S. reticulata</i> leaf		1.0% <i>S. reticulata</i> leaf		0.5% Galacto-oligosaccharide	
Food intake (g/mouse)	41.1		45.0		45.5		46.1		42.0		42.6	
Body weight gain (g/mouse)	9.0		8.8		9.7		9.5		9.1		9.1	
Cytokines												
IL-4												
intestine (ng/g)	7.52 ± 0.49	6.85 ± 0.32	6.14 ± 0.16*	7.08 ± 0.19	6.14 ± 0.16*	7.08 ± 0.19	6.55 ± 0.11	7.62 ± 0.55	6.55 ± 0.11	7.62 ± 0.55	7.62 ± 0.55	0.53 ± 0.19
serum (pg/mL)	0.57 ± 0.30	0.66 ± 0.28	0.49 ± 0.02	0.59 ± 0.05	0.49 ± 0.02	0.59 ± 0.05	0.44 ± 0.15	0.53 ± 0.19	0.44 ± 0.15	0.53 ± 0.19	0.53 ± 0.19	0.53 ± 0.19
IL-5												
intestine (ng/g)	62.9 ± 6.2	61.4 ± 5.9	68.1 ± 4.8	66.8 ± 5.5	68.1 ± 4.8	66.8 ± 5.5	72.0 ± 4.1	75.7 ± 3.4	72.0 ± 4.1	75.7 ± 3.4	75.7 ± 3.4	75.7 ± 3.4
spleen (ng/g)	8.18 ± 0.77	7.03 ± 0.37	5.98 ± 0.75	8.66 ± 0.78	5.98 ± 0.75	8.66 ± 0.78	7.17 ± 0.91	8.05 ± 1.80	7.17 ± 0.91	8.05 ± 1.80	8.05 ± 1.80	8.05 ± 1.80
serum (pg/mL)	9.50 ± 0.17	9.45 ± 0.65	8.63 ± 0.71	9.18 ± 0.36	8.63 ± 0.71	9.18 ± 0.36	9.10 ± 0.57	8.15 ± 0.28*	9.10 ± 0.57	8.15 ± 0.28*	8.15 ± 0.28*	8.15 ± 0.28*
IL-6												
intestine (ng/g)	11.50 ± 4.23	23.49 ± 3.89	23.32 ± 3.68	11.67 ± 2.20	23.32 ± 3.68	11.67 ± 2.20	14.57 ± 4.38	23.72 ± 5.31	14.57 ± 4.38	23.72 ± 5.31	23.72 ± 5.31	23.72 ± 5.31
spleen (ng/g)	11.01 ± 1.25	11.42 ± 0.77	11.10 ± 0.99	13.63 ± 2.04	11.10 ± 0.99	13.63 ± 2.04	10.17 ± 1.04	12.66 ± 0.37	10.17 ± 1.04	12.66 ± 0.37	12.66 ± 0.37	12.66 ± 0.37
serum (pg/mL)	9.25 ± 0.65	8.66 ± 1.23	9.85 ± 1.24	12.00 ± 0.82*	9.85 ± 1.24	12.00 ± 0.82*	13.59 ± 1.04*	6.60 ± 1.93	13.59 ± 1.04*	6.60 ± 1.93	6.60 ± 1.93	6.60 ± 1.93
IL-10												
intestine (ng/g)	5.09 ± 1.09	11.93 ± 2.02*	16.00 ± 2.91*	6.78 ± 0.49	16.00 ± 2.91*	6.78 ± 0.49	12.01 ± 2.36*	14.12 ± 2.38*	12.01 ± 2.36*	14.12 ± 2.38*	14.12 ± 2.38*	14.12 ± 2.38*
serum (pg/mL)	35.34 ± 7.40	34.79 ± 4.35	53.39 ± 5.03	49.12 ± 2.46	53.39 ± 5.03	49.12 ± 2.46	61.93 ± 14.61	89.67 ± 7.83**	61.93 ± 14.61	89.67 ± 7.83**	89.67 ± 7.83**	89.67 ± 7.83**
IL-12												
intestine (ng/g)	9.41 ± 0.51	10.17 ± 0.47	11.35 ± 0.94	11.82 ± 0.43*	11.35 ± 0.94	11.82 ± 0.43*	10.02 ± 0.21	11.39 ± 0.81	10.02 ± 0.21	11.39 ± 0.81	11.39 ± 0.81	11.39 ± 0.81
serum (pg/mL)	12.44 ± 3.35	26.46 ± 7.53	26.16 ± 2.30*	27.11 ± 5.09*	26.16 ± 2.30*	27.11 ± 5.09*	19.45 ± 6.60	9.11 ± 2.85	19.45 ± 6.60	9.11 ± 2.85	9.11 ± 2.85	9.11 ± 2.85
IL-13												
intestine (ng/g)	7.58 ± 1.24	10.5 ± 1.05	9.12 ± 1.87	7.39 ± 1.40	9.12 ± 1.87	7.39 ± 1.40	5.80 ± 0.58	10.2 ± 0.75	5.80 ± 0.58	10.2 ± 0.75	10.2 ± 0.75	10.2 ± 0.75
serum (pg/mL)	11.00 ± 0.96	11.40 ± 0.55	9.70 ± 0.61	11.22 ± 0.37	9.70 ± 0.61	11.22 ± 0.37	9.76 ± 1.22	10.32 ± 0.69	9.76 ± 1.22	10.32 ± 0.69	10.32 ± 0.69	10.32 ± 0.69
IL-17												
intestine (ng/g)	40.46 ± 3.07	38.09 ± 2.45	37.00 ± 3.06	37.52 ± 4.59	37.00 ± 3.06	37.52 ± 4.59	37.36 ± 1.77	38.67 ± 5.35	37.36 ± 1.77	38.67 ± 5.35	38.67 ± 5.35	38.67 ± 5.35
serum (pg/mL)	200.40 ± 15.21	188.68 ± 12.12	183.30 ± 15.18	185.83 ± 22.75	183.30 ± 15.18	185.83 ± 22.75	192.48 ± 10.09	191.53 ± 26.50	192.48 ± 10.09	191.53 ± 26.50	191.53 ± 26.50	191.53 ± 26.50
IFN-γ												
intestine (ng/g)	9.01 ± 0.27	11.24 ± 0.51**	11.49 ± 0.76*	10.05 ± 0.30*	11.49 ± 0.76*	10.05 ± 0.30*	10.85 ± 0.73*	11.05 ± 0.80	10.85 ± 0.73*	11.05 ± 0.80	11.05 ± 0.80	11.05 ± 0.80
serum (ng/mL)	25.11 ± 1.45	28.30 ± 0.49	27.91 ± 1.18	25.97 ± 1.71	27.91 ± 1.18	25.97 ± 1.71	26.71 ± 1.03	31.36 ± 1.21*	26.71 ± 1.03	31.36 ± 1.21*	31.36 ± 1.21*	31.36 ± 1.21*
Antibodies												
IgA												
intestine (μg/g)	62.86 ± 6.16	61.45 ± 5.89	68.11 ± 4.48	66.77 ± 5.46	68.11 ± 4.48	66.77 ± 5.46	71.97 ± 4.12	75.69 ± 3.41	71.97 ± 4.12	75.69 ± 3.41	75.69 ± 3.41	75.69 ± 3.41
spleen (ng/g)	860.81 ± 38.42	921.85 ± 8.28	927.49 ± 3.52	892.01 ± 26.99	927.49 ± 3.52	892.01 ± 26.99	939.05 ± 11.25	876.46 ± 52.37	939.05 ± 11.25	876.46 ± 52.37	876.46 ± 52.37	876.46 ± 52.37
serum (ng/mL)	115.21 ± 16.64	167.58 ± 35.76	185.84 ± 31.63	184.83 ± 4.21**	185.84 ± 31.63	184.83 ± 4.21**	219.22 ± 48.16	175.04 ± 6.55*	219.22 ± 48.16	175.04 ± 6.55*	175.04 ± 6.55*	175.04 ± 6.55*
IgE												
intestine (μg/g)	0.171 ± 0.006	0.170 ± 0.001	0.164 ± 0.004	0.157 ± 0.003	0.164 ± 0.004	0.157 ± 0.003	0.172 ± 0.003	0.172 ± 0.006	0.172 ± 0.003	0.172 ± 0.006	0.172 ± 0.006	0.172 ± 0.006
serum (ng/mL)	6.77 ± 2.15	3.90 ± 0.75	5.19 ± 0.80	3.27 ± 1.18	5.19 ± 0.80	3.27 ± 1.18	4.99 ± 0.38	4.45 ± 0.49	4.99 ± 0.38	4.45 ± 0.49	4.45 ± 0.49	4.45 ± 0.49
IgG												
intestine (μg/g)	11.03 ± 0.27	11.23 ± 0.51	10.66 ± 0.50	11.59 ± 0.36	10.66 ± 0.50	11.59 ± 0.36	9.19 ± 0.75	5.54 ± 1.96*	9.19 ± 0.75	5.54 ± 1.96*	5.54 ± 1.96*	5.54 ± 1.96*
spleen (ng/g)	38.15 ± 0.48	40.61 ± 1.69	33.89 ± 2.11	36.77 ± 4.10	33.89 ± 2.11	36.77 ± 4.10	33.88 ± 2.91	31.13 ± 1.00**	33.88 ± 2.91	31.13 ± 1.00**	31.13 ± 1.00**	31.13 ± 1.00**
serum (ng/mL)	325.42 ± 95.07	221.72 ± 106.03	168.45 ± 80.29	265.92 ± 82.58	168.45 ± 80.29	265.92 ± 82.58	190.77 ± 55.46	196.80 ± 53.70	190.77 ± 55.46	196.80 ± 53.70	196.80 ± 53.70	196.80 ± 53.70
Lipid peroxides												
TBARS												
intestine (nmol/g)	72.76 ± 5.35	56.59 ± 6.84	60.94 ± 6.34	69.18 ± 1.49	60.94 ± 6.34	69.18 ± 1.49	65.96 ± 6.23	66.33 ± 1.04	65.96 ± 6.23	66.33 ± 1.04	66.33 ± 1.04	66.33 ± 1.04
serum (nmol/mL)	8.48 ± 0.71	5.19 ± 2.36	6.59 ± 1.71	7.69 ± 0.28	6.59 ± 1.71	7.69 ± 0.28	6.89 ± 0.99	7.59 ± 0.84	6.89 ± 0.99	7.59 ± 0.84	7.59 ± 0.84	7.59 ± 0.84

Values are the means ± SEM. N = 5. Significant difference from control group: *P<0.05, **P<0.01.

S. reticulata の幹摂取群では、対照群に比較して低下傾向が見られた。一方、IgA を産生する B 細胞の活性化に関わるもう一つのサイトカインである IL-10 のレベルについては、腸管と血清において、いずれの試料摂取群でも対照群に比較して上昇する傾向が見られ、特に腸管ではそれぞれ有意な上昇が認められた。IL-10 は Th2 細胞も産生するが、Mφや制御性 T (Treg) 細胞によっても産生される。そのため、Th2 細胞関連の免疫系が抑制されて IL-5 レベルは上昇しなかった一方で IL-10 は Mφや Treg 細胞により産生されたものと予想される。増加した IL-10 は、Treg 細胞の分化を促すことで免疫寛容を誘導し、Th2 細胞および IgE や IgG を産生する B 細胞の活動を抑制したものと考えられる。IL-10 と同様に、IgA 産生 B 細胞を活性化する IL-6 のレベルも、腸管では *S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取群で対照群に比較して上昇する傾向が見られ、血清でも特に *S. reticulata* の葉摂取群では有意な上昇が認められた。脾臓の IL-6 レベルも、*S. reticulata* の葉およびガラクトオリゴ糖の摂取群で対照群より上昇する傾向が見られた。

腸管、脾臓および血清の IgA レベルは、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取群で、対照群に比較して上昇傾向が見られ、IL-6 や IL-10 のレベルの上昇が IgA 産生 B 細胞の活性化を引き起こしたものと考えられる。特に、*S. reticulata* の葉およびガラクトオリゴ糖の摂取群の血清で、IgA レベルの有意な上昇が認められた。

以上の結果から、*S. reticulata* の幹または葉の摂取により、Th2 細胞が誘導する体液性抗体応答のうち、腸管、脾臓や血清中での主要抗体であるとともにアルツス型のアレルギーに関与する抗体である IgG やアナフィラキシー型のアレルギーに関与する抗体である IgE の産生系は抑

制され、一方で、体外で抗原の侵入を抑制したりそれを失活させる分泌型抗体の IgA の産生は高まる可能性が示唆された。我々は、これまでに *S. reticulata* の幹または葉が、マウスにおける卵白アルブミン誘発アナフィラキシー型アレルギー反応を抑制することを報告している[4]。

3. 2 マウスの細胞性免疫応答に対する *S. reticulata* の影響

細胞性免疫応答を惹起する Th1 細胞関連サイトカインである IL-12、IFN- γ のマウスの腸管および血清でのレベルは、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取群において、対照群に比較してほぼ上昇する傾向が見られた。特に、*S. reticulata* の幹摂取群の血清 IL-12、腸管 IFN- γ 、*S. reticulata* の葉摂取群の腸管および血清 IL-12、腸管 IFN- γ 、ガラクトオリゴ糖摂取群の血清 IFN- γ の各レベルで、有意な上昇が認められた。これらの試料の摂取で、樹状細胞による IL-12 の産生が促進されたものと考えられる。これにより Mφが活性化され、既述の IL-6、IL-10 レベルの上昇が起きたものと思われる。

IL-12 や IFN- γ といった前炎症性サイトカインにより Th1 細胞が活性化されると、Mφやナチュラルキラー (NK) 細胞等によるウイルス感染細胞等に対する細胞性応答が高まる一方で、Mφが産生する活性酸素等により炎症が生じる可能性がある。また、腸管には、Th1 細胞および Th2 細胞の関連する主要な免疫系以外にも、Th17 細胞が関与する特異な炎症系等が存在する。樹状細胞が産生する IL-6 は Th17 細胞を活性化するとされており、既述のように腸管、脾臓、血清の IL-6 レベルは、*S. reticulata* の摂取で上昇する傾向を示した。しかしながら、マウスの腸管および血清の過酸化脂質レベルを測定したところ、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取群のいずれにおいても、対照群に比較して低下する傾向が見られた。Th17 細胞が産生する

とされる IL-17 レベルを腸管と血清について測定したところ、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取群のいずれにおいても、対照群に比較して低下する傾向が見られた。これらの結果から、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取では、Th1 細胞が関与する細胞性免疫応答が上昇する一方で、炎症は起こり難い状況にあるものと考えられる。炎症反応の抑制は、IL-10 により活性化された Treg によるものであることが予想される。

これまでに、サラシア属植物のエキスをラットに経口投与した場合、小腸上皮細胞において多数の免疫関連遺伝子、特に Th1 細胞関連遺伝子の発現が増加することが報告されている[7]。これは、今回の研究結果と一致するものである。また、インフルエンザウイルスに感染させたマウスにサラシア属植物のエキスを経口投与することで、細胞性応答に関連して脾臓と肺で NK 細胞活性が上昇するとともに、咳の減少や肺炎による組織障害の軽減が見られている[14]。プレバイオティクスの一つと考えられるシイタケのβ-1,3-グルカンに、Th1 細胞の活性化により誘導される NK 細胞の活性化作用が認められており[15]、*S. reticulata* の幹または葉も同様の効果が期待できるものと考えられる。炎症については、我々は、*S. reticulata* の幹または葉の水抽出物が、マウスの接触皮膚炎を抑制することを報告しており、過剰な細胞性応答に対しては抑制作用を示すことがわかっている[5]。

今回の実験では、多くの測定項目で、マウスの腸管と血清におけるサイトカインや抗体のレベルの変動が類似していた。しかし、中には IL-13 レベルのように、腸管では上昇しても全身の状態を反映すると考えられる血清では低下する傾向が見られ、腸管において特異的な変動が認められる場合があった。*S. reticulata* の幹では、腸管の場合と異なり、健常マウスの肝臓の炎症/免疫関連遺

伝子には変化が見られないという報告[16]があり、腸管免疫系への影響は他の身体の部位とは異なることが予想される。

3.3 マウスの腸内菌叢に対する *S. reticulata* の影響

一般に、プレバイオティクスである食物繊維や難消化性オリゴ糖には、腸内の *Bifidobacterium* 属等の有用細菌の増殖と整腸作用に関連すると考えられる免疫調節作用や抗炎症作用があることが知られている[17]。プレバイオティクスにより腸内で増加するプロバイオティクスの代表的なものとしては、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の細菌がある。その保健作用としては、腸管感染症の予防や整腸作用[18-20]の他、腸管免疫系への影響がある。プロバイオティクスは自然免疫系の食細胞を刺激し、抗原提示機能を高めて獲得免疫系を活性化する他、腸管腔に分泌される IgA 産生能の亢進、IgE、IgG 等による体液性免疫の抑制、NK 細胞の活性化によるウイルス感染細胞、がん細胞の増殖抑制等の効果があるとされている[18,19]。

サラシア属植物による動物の腸内菌叢に対する効果に関しては、これまでに次のような報告がある。サラシア属植物のヒトへの投与で、糞便中のアンモニア量が減少するとともに、その pH が低下するため、腸内菌による単鎖脂肪酸の産生が推測される[21]。さらに、ヒトの腸内菌叢で *Bifidobacterium* 属の増加と *Clostridium* 属の減少がみられる[22]。ラットへの投与では、腸内菌叢で *Firmicutes* 門の比率が減少し、*Bacteroidetes* 門の比率が増加する。*Bacteroidetes* 門の細菌は、乳酸菌よりも強い免疫賦活作用があり IgA の産生を高める。

今回の実験でも、*S. reticulata* の幹または葉は、プレバイオティクスであるガラクトオリゴ糖と類似の効果を示したことから、腸内菌叢への影響が予想された。そこで、*S. reticulata* の幹または葉

を7日間投与したマウスの糞中の乳酸菌数を測定したところ、Table 2 に示す結果となった。MRS 培地で増殖した乳酸菌のコロニー数は、*S. reticulata* の幹または葉、ガラクトオリゴ糖の摂取で、対照群に比較してそれぞれ 1.03 倍、1.71 倍、1.85 倍に増加した。特に、*S. reticulata* の葉およびガラクトオリゴ糖の摂取での増加が著しかった。また、ヨーグルトの一日摂取により、対照群の乳酸菌のコロニー数は、健常群に比較して 1.41 倍に増加した。

28 日間飼育の実験において、ヨーグルトを前投与せず通常飼料で飼育した群と、それ以外の群のそれぞれのマウスの糞について、含まれる細菌の DNA を PCR-DGGE 法で分析し比較した。まず、対照群では、ヨーグルトを前投与しなかった群に比較して *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属と思われる細菌由来の DNA 量の増加が見られた。*S. reticulata* の葉の投与群では、対照群に比較してさらに、主に *Lactobacillus* 属と思われる細菌由来の DNA 量の増加が認められた (Fig. 2)。マウスの糞は乾燥し易いため含有細菌の保存が難しい面があるが、今後、検出されたそれぞれの DNA の由来菌種を同定する必要がある。

腸内菌叢に対する効果は、菌叢の違いがあるため、直接マウスやラットの結果がヒトに当てはまるわけではないが、免疫系への *S. reticulata* の免疫系への効果はヒトにおいても期待できるものと考えられる。本研究の結果から、特に *S. reticulata* の葉のマウス免疫系に対する作用に、そのプレバイオティクス効果により腸内で増殖した乳酸菌類が関与している可能性が示唆された。今回の実験で観察された、*S. reticulata* の幹や葉の摂取による、マウス腸管における IgA 産生能の増加や Th1 細胞関連サイトカイン類の増加は、ラットを用いた過去の研究の報告[7,22]と一致していた。しかし、*S. reticulata* の幹では、明確な腸内菌の増加が見られず、プレバイオティクス効果以外のメカニズム

Table 2 Effects of the oral administrations of the stems and the leaves of *Salacia reticulata* on mouse fecal lactic acid bacteria

Groups	CFU/g
Normal	327x10 ³
Control	462x10 ³
1.0% <i>S. reticulata</i> stem	476x10 ³
1.0% <i>S. reticulata</i> leaf	788x10 ³
0.5% Galacto-oligosaccharide	855x10 ³

CFU: colony-forming units.

も予想される。腸管免疫系は、多くの因子が関係する複雑なシステムであり、今回測定できたサイトカイン類や抗体類はその一部でしかない。今後も、さらに多くの関連因子の変動を観察することで、*S. reticulata* の幹または葉の腸管免疫系に対する作用のメカニズムを明らかにしていく必要があるものと考えられる。

4. まとめ

S. reticulata の幹または葉の長期摂取による、マウス腸管、脾臓および血清における免疫系の

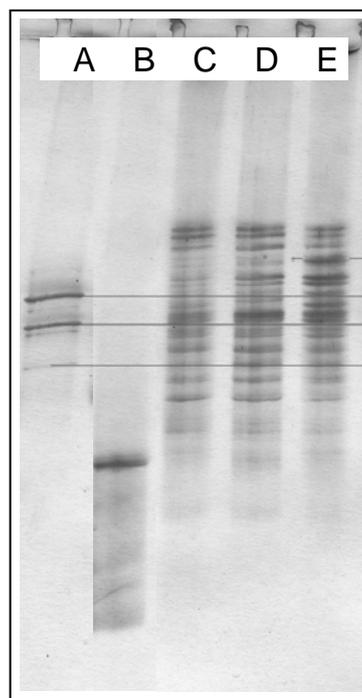


Fig. 2 PCR-DGGE profiles of bacterial 16S rDNA V3 fragments from feces of mice fed *Salacia reticulata* samples.

A; lactobacilli from commercial yogurt, B; bifidobacteria from commercial yogurt, C; Normal, D; Control, E; 1.0% *S. reticulata* leaf.

変動に対する影響を検討した。その結果、*S. reticulata* の幹または葉の摂取は、マウスの腸管や全身の免疫系において、体液性抗体応答の抑制、Treg 細胞による免疫寛容の誘導、細胞性免疫応答の活性化による IgA の産生、酸化ストレスと炎症の抑制、IL-17 に関連する特異炎症系の抑制といった様々な免疫調節機能を発揮することが示唆された。

S. reticulata を含むサラシア属植物の食品としての安全性については、産地におけるこれまでの長い食習慣だけでなく、亜慢性毒性や遺伝毒性などについて確認されている[16,23,24]。また、今回の研究においても、*S. reticulata* の幹および葉の粉砕物を 0.5%または 1.0%添加した飼料を 28 日間自由摂取させた場合、マウスの外見および臓器等に肉眼的な異常な所見は認められなかった。従って、*S. reticulata* の幹および葉は、動物の免疫機能を調節する効果を持つ安全な食品素材として期待される。

参考文献

- 1) 吉川雅之, 薬用植物の糖尿病予防成分 医食同源の観点から. 化学と生物, vol.40, pp.172-178 (2002).
- 2) M. Modak, P. Dixit, J. Londhe, S. Ghaskadbi, T.P.A. Devasagayam, Indian herbs and herbal drags used for the treatment of diabetes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol.40, pp.163-173 (2007).
- 3) 金高 隆, 古賀邦正, 腸内環境改善作用を有する食品組成物. 特願 2005-217267, 特開 2007-31345.
- 4) 芳野恭士, 岸 由紀乃, 金高 隆, 古賀邦正, *Salacia reticulata* の卵アルブミン誘発 I 型アレルギー反応におけるマウス腹壁血管透過性亢進抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌, vol.65, pp.221-227 (2012).
- 5) 芳野恭士, 宮本潤基, 間部涼祐, 近藤郁美子, 善養寺優香, 金高 隆, 古賀邦正, *Salacia reticulata* のマウス接触皮膚炎抑制作用. 技術・教育研究論文誌, vol.19, pp.51-61 (2012).
- 6) Y. Bouhnik, L. Raskine, G. Simoneau, D. Paineau, F. Bornet, The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate fecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr. J.*, vol.28, pp.5-8 (2006).
- 7) Y. Oda, F. Ueda, A. Kamei, C. Kakinuma, K. Abe, Biochemical investigation and gene expression analysis of the immunostimulatory functions of an edible *Salacia* extract in rat small intestine. *BioFactors*, vol.37, pp.31-39 (2011).
- 8) K. Yagi, A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, vol.15, pp.212-216 (1976).
- 9) 真杉文紀, 中村哲也, Sodium dodecylsulphate 可溶化による肝チオバルビツール酸値とビタミン E, 薬物によるその変動. ビタミン, vol.51, pp.21-29 (1977).
- 10) 渡部侑子, 腸内細菌で健康を守る. *New Food Industry*, vol.40, pp.9-16 (1998).
- 11) S. Ishizuka, Dietary fiber: A new modulator for distribution of immune cells around intestinal crypts. *FFI Journal*, vol.210, pp.917-928 (2005).
- 12) K. Yoshino, Y. Miyauchi, T. Kanetaka, Y. Takagi, K. Koga, Anti-diabetic activities of leaf extracts prepared from *Salacia reticulata* in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol.73, pp.1096-1104 (2009).
- 13) 佐藤岳治, 中村泰之, 小澤 修, ガラクトオリゴ糖がマウスの免疫系に与える影響. 日本栄養・食糧学会誌, vol.61, pp.79-88 (2008).
- 14) 小田由里子, 植田文教, 永田幸三, 腸内細菌叢調節を介したサラシア属植物エキスのインフルエンザ症状軽減作用. 第5回サラシア属

- 植物シンポジウム講演要旨集, pp.28-34 (2012).
- 15) J.P. Fruehauf, G.D. Bonnard, R.B. Herberman, The effect of lentinan on production of interleukin-1 by human monocytes. *Immunopharmacology*, vol.5, pp.65-74 (1983).
- 16) R. Im, H. Mano, S. Nakatani, J. Shimizu, M. Wada, Safety evaluation of the aqueous extract Kothala Himbutu (*Salacia reticulata*) stem in the hepatic gene expression profile of normal mice using DNA microarrays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol.72, pp.3075-3083 (2008).
- 17) 谷口 肇, 機能性オリゴ糖. *medicina*, vol.39, pp.275-277 (2002).
- 18) 光岡知足, 他, プロバイオティクスと健康～健腸長寿を願って～. ヘルシスト, 150号 記念特集号 (2001).
- 19) 郷木達雄, ラクトバチルス カゼイシロタ株の生理効果. *食品工業*, vol.39, pp.24-30 (1996).
- 20) 田村吉隆, 石橋憲雄, 機能性食品としてのプロバイオティクス. *化学装置*, vol.4, pp.53-56 (2003).
- 21) 植田文教, 池田賢治, 高島正伸, サラシア属植物の抽出成分の腸内環境への作用. 第1回サラシア属植物シンポジウム講演要旨集, pp.42-47 (2008).
- 22) 小田由里子, 植田文教, 中村善貞, サラシア属植物エキスの腸内細菌叢に対する作用. 第3回サラシア属植物シンポジウム講演要旨集, pp.56-62 (2010).
- 23) A.M. Flammang, G.L. Erexson, M.S. Mecchi, H. Murli, Genotoxicity testing of a *Salacia oblonga* extract. *Food Chem. Toxicol.*, vol.44, pp.1868-1874 (2006).
- 24) A.M. Flammang, G.L. Erexson, J.M. Mirwald, S.M. Henwood, Toxicological and cytogenetic assessment of a *Salacia oblonga* extract in a rat subchronic study. *Food Chem. Toxicol.*, vol.45, pp.1954-1962 (2007).