

〈研究ノート〉

キノア葉部の抗炎症性について

吉原 結希, 磯部 勝孝, 高尾 哲也

Anti-inflammatory activity of the Quinoa leaf

Yuki YOSHIHARA, Katsutaka ISOBE, Tetsuya TAKAO

The antiinflammatory activity of quinoa leaves

Quinoa leaves are not used in Japan, but the current study examined the antiinflammatory activity of those leaves. Materials were a hot water extract (H-) and a water extract (R-) of 4 varieties of quinoa: Baer-2, NL-6, RU-2, and Marangani. A model of intestinal absorption and inflammation was created by culturing Caco-2 intestinal epithelial cells and RBL-2H3 mast cells or RAW264.7 macrophages on a porous membrane. Each extract was added to Caco-2 cells mimicking mucosal epithelium, and cytokine expression in RBL-2H3 and RAW264.7 cells or the amount of cytokines produced by those cells was measured. H-NL-6 and H-RU-2 inhibited $\text{TFN}\alpha$ expression in RBL-2H3 cells. R-Baer-2 limited the production of IL-6, and H-Baer-2 limited the production of IL-17. R-NL-6 limited the production of $\text{TFN}\alpha$. These findings indicate that the antiinflammatory action of quinoa leaves differs depending on the variety of quinoa and the type of extract used. Moreover, extracts from quinoa leaves can presumably reduce inflammation when taken orally.

背景

キノア (*Chenopodium quinoa* Willd.) は、南アメリカのアンデス地方の高地が原産のアカザ科アカザ属の1年草である。キノアは高さ80~150 cmの植物体先端部の密に枝分かれした部分に種子をつける¹⁾。種子は広く食用とされ、国内でも食用として販売、利用されている。また日本国内でも少量ではあるが栽培されている。日本では、近年栄養価の高さや栄養バランスの良さから²⁻⁴⁾、健康志向とともに知名度が上昇している。また、栄養機能のみならず、生理機能に関する研究が行われている。キノア果皮にはコレステロー

ル低下作用があり、その活性物質はペクチンであることが報告されている⁵⁾。また高リジン・高カルシウムであることや、イネ科の小麦や米に対し、キノアがアカザ科で植物分類学上異なるため、アレルギー患者の代替食品として期待できると考えられている⁶⁾。キノアの種子は日本においても、他の雑穀と共に各種の食品で利用されている。これに対し、キノアの葉はアンデス地方の高地では食用とされているが、日本国内では利用されていない。葉の機能性成分には、アポトーシス誘導やヒスタミン放出抑制、SOD様活性などの生理活性作用を示すケルセチン、瀉下作用や抗ア

レルギー活性を示すケンフェロール配糖体、抗腫瘍活性などを示すイソラムネチン配糖体が含まれていることが報告されている⁷⁾。しかし、実際に葉を試料とした生物活性について報告はされていない。また、キノアの品種の違いによる生物活性の違いなどについての報告もされていない。そこで本研究では、4品種のキノア葉部を試料としてそれぞれの抗炎症作用を検討し、新たな機能性素材としての可能性を見出すことを目的として本研究を行った。

試料

キノア

日本大学生物資源科学部圃場で栽培された Baer-2, NL-6, RU-2, Amarilla de Marangani (Marangani) の4品種のキノア葉部を使用した。4品種のうち、Baer-2, NL-6, RU-2はチリの平野部で栽培されている品種であり、Maranganiはペルーの主に標高2,000m程度の高原地帯で栽培されている品種である。葉は収穫期の植物体全体から採取し、採集後直ちに-20℃で保存した。

Baer-2, NL-6, RU-2及びMaranganiは試料量の10倍量のイオン交換水で30分ずつ2回水抽出した後、凍結乾燥させたものを水抽出試料とした(R-品種名)。また、Baer-2, NL-6, RU-2は試料量の40倍量の沸騰したイオン交換水で1時間熱水抽出後、凍結乾燥させて熱水抽出試料とした(H-品種名)。

細胞株

Caco2

ヒトの結腸癌由来Caco2を小腸粘膜モデル細胞として使用した。Caco2は多孔性メンブレンフィルター上に培養すると、小腸円柱上皮細胞様に分化する。Caco2単層膜の粘膜上皮側には微細柔突起が多く、培養すると融合性単層膜を形成して分化が進み、小腸の刷子縁膜やタイトジャンク

ションの特徴に類似した構造になる。培養条件や期間によって、各種トランスポーターや代謝酵素などの小腸機能を発現することや、物質吸収・輸送の特性が小腸と類似している⁸⁾。Caco2の培養にはMEM培地に10%牛血清を加えて使用し、CO₂ 5%、37℃の環境下で培養した。

RBL-2H3

ラット白血病由来のRBL-2H3を肥満細胞のモデル細胞として使用した。RBL-2H3細胞は、体内に存在する肥満細胞とは形状は異なるがその機能の多くを発現している。培養したRBL-2H3細胞をDNP-specific IgEにより感作し、DNP-BSAの添加により刺激を加えることで、サイトカイン類の発現とヒスタミン放出をさせ、実験的にアレルギー状態を作り出す事が可能である⁹⁾。RBL-2H3の培養にはMEM培地に10%牛血清を加えて使用し、CO₂ 5%、37℃の環境下で培養した。

RAW264.7

マウスの腹水由来細胞であるRAW264.7をマクロファージのモデル細胞として使用した¹⁰⁾。RAW264.7はマクロファージ様の特徴を示し、リポポリサッカライド(LPS)で刺激する事により各種炎症性サイトカインを生産する。RAW264.7の培養にはPRMI1640培地に10%牛血清を加えて使用し、CO₂ 5%、37℃の環境下で培養した。

方法

RBL-2H3を用いたTNF- α 発現量の測定

肥満細胞におけるTNF- α 発現量の検討を行った。Caco-2細胞を24wellコラーゲンインサートに 2.0×10^5 cells/wellになる様に調整して播種し、分化用培地(CORNING社製)を用いてCO₂ 5%、37℃で72時間培養し、細胞に単層を形成させると共に小腸粘膜上皮状に分化させた。Caco2がインサートの多孔膜上に単層上皮やタイトジャ

ンクシオン様の形成をしているかを TEER (経上皮抵抗: Transepithelial / transendothelial electrical resistance) の測定により確認した。これとは別に, RBL-2H3 を培養後, DNP specific IgE を感作させ, 5.0×10^5 cells/well になる様 24well プレートに播種し CO_2 5%, 37°C で 18 時間培養した。DNP specific IgE により感作した RBL-2H3 のウェルに Caco2 が生育したインサートを重ね, 小腸モデルを作成した。1 mg/ml もしくは 10 mg/ml に濃度調製した Baer-2, NL-6, RU-2 の熱水抽出物試料を Caco2 の粘膜上皮側に添加し, RBL-2H3 細胞と共に 1 時間 CO_2 5%, 37°C でインキュベートした。その後, RBL-2H3 に $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に濃度調製した DNP-BSA を添加し 1 時間インキュベートして刺激を与え, アレルギー状態を作り出した。その後 RBL-2H3 細胞を取得した。取得した RBL-2H3 細胞は RNA later (Ambion 社製) 中で保存した。細胞を Trizol Regent (Ambion 社製) に懸濁後, クロロホルムを添加し, 遠心分離後上清を取得した。取得した上清に 2-propanol を添加し遠心分離後沈殿を取得した。沈殿に Ethanol を添加し, 遠心分離後の沈殿を total RNA として取得した。取得した total RNA は RNase free の水に溶解し, Prime Script (タカラバイオ社製) 逆転写酵素およびランダムプライマー (Invitrogen 社製) により逆転写を行い, cDNA を取得した。取得した cDNA を用いて, TNF- α 用プライマー, Ex-Taq (タカラバイオ社製) を用いて PCR により増幅後, BioAnalyzer2100 (Agilent 社製) マイクロキャピラリー電気泳動により解析を行った。

RAW264.7 を用いたサイトカイン類生産量の測定

マクロファージにおける炎症性サイトカイン発現および生産の検討を行った。Caco2 を 24 well コラーゲンカップに 2.0×10^5 cells/well になるよう調整して播種し, 分化用培地 (CORNING 社

製) を用いて CO_2 5%, 37°C で 3 日間培養し, 細胞に単層を形成させると共に小腸粘膜上皮状に分化させた。Caco2 がインサートの多孔膜上に単層上皮やタイトジャンクション様の形成をしているかを TEER の測定により確認した。 1.0×10^5 cells/well になるよう調整した RAW264.7 細胞を, 24well プレートに播種し CO_2 5%, 37°C で 24 時間培養した。最終濃度 2 ng/mL の LPS で刺激した RAW264.7 のウェルに Caco2 が生育したインサートを重ね, 腸管吸収後のマクロファージモデルを作成した。10 mg/ml に調整した各抽出物試料を Caco-2 細胞の粘膜上皮側に添加し, RAW264.7 細胞と共に 6 時間 CO_2 5%, 37°C でインキュベートした。6 時間後に RAW264.7 の処理上清を取得した。取得した上清をサイトカイン類生産量測定用試料とした。サイトカイン類の測定には, Bio-Plex Pro サイトカインアッセイを用いた。測定したサイトカイン類は, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α の 23 種類とした。また, 刺激後の RAW264.7 の細胞を取得して RT-PCR 法により TNF- α 発現量を測定した。

統計処理

得られた測定結果は Dunnett (有意水準 5% および 10%) の方法を用いて対照群と各抽出物試料群との間で検定を行った。

結果

RBL-2H3 を用いた TNF- α 発現量の測定

Baer-2, NL-6, RU-2 の熱水抽出物 (10 mg/ml) を Caco2 粘膜上皮側に添加し, アレルギー処理を行った RBL-2H3 の TNF- α 発現量の変化を図 1 に示した。TNF- α 発現量は, H-NL-6 お

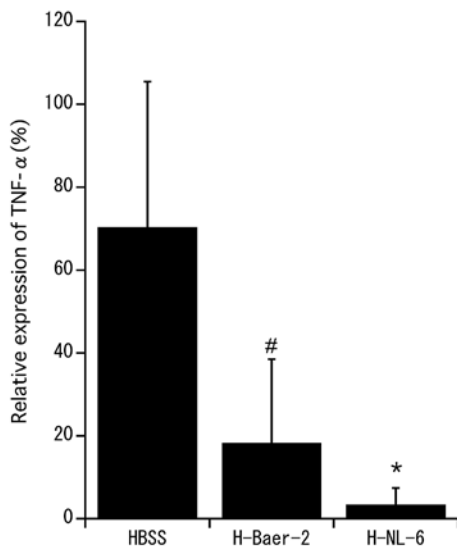


図1 Baer-2, NL-6, RU-2の熱水抽出物添加によるRBL-2 H3のTNF- α 発現量の変化
n=3, *: p<0.05, #: p<0.1

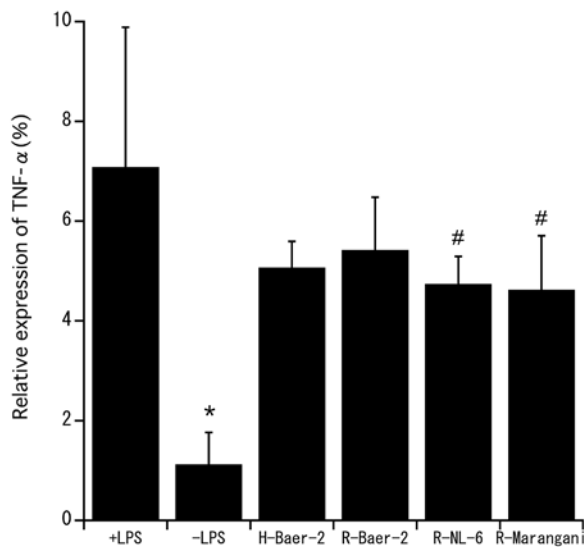


図2 Baer-2, NL-6, Marangani抽出物添加によるRAW264.7のTNF- α 発現量の変化
n=3, *: p<0.05, #: p<0.1

よびH-RU-2において対照群であるHBSS (Hank's Balanced Salt Solution) に比べて低下した。低下量は、各々95%, 76%であった。H-Baer-2はコントロールに比べTNF- α 発現量が低下する傾向を示し、低下量は74%であった。

RAW264.7細胞を用いたTNF- α 発現量の測定

Caco2粘膜上皮側へのBaer-2の熱水抽出物(10mg/ml)および、Baer-2, NL-6, Maranganiの水抽出物(10mg/ml)添加による、LPS刺激を行ったRAW264.7のTNF- α の相対的発現量を図2に示した。LPS刺激を行い、抽出物試料を添加していないLPS刺激群(+LPS)を対照群とした。R-NL-6とR-Maranganiは、+LPSと比較して発現量が低下する傾向が認められ、低下量は各々33%, 35%であった。

RAW264.7を用いたサイトカイン類生産量の測定

Caco2粘膜上皮側へのBaer-2の熱水抽出物(10mg/ml)および、Baer-2, NL-6, Marangani

の水抽出物(10mg/ml)添加による、RAW264.7炎症性サイトカイン類生産量の変化を表1に示した。+LPSを対照群とした。LPS刺激によりIL-9を除く全ての炎症性サイトカイン量は、LPSにより刺激しない場合に比べて増加した。IL-5は検出されなかった。キノア葉部抽出物の添加により、対照群である+LPSに比べ上昇したサイトカイン類は認められなかった。IL-3の生産量はLPS刺激したものに比べ測定した全ての試料、H-Baer-2, R-Baer-2, R-NL-6, R-Maranganiで低下した。低下量はH-Baer-2で51%, R-Baer-2で52%, R-NL-6で44%, R-Maranganiで66%であった。IL-2の生産量はR-NL-6により31%低下した。IL-6の生産量はR-Baer-2により低下する傾向を示し、低下量は30%であった。IL-10の生産量はR-Maranganiにより27%低下し、R-Baer-2により18%低下する傾向を示した。IL-17の生産量はH-Baer-2により43%低下し、R-NL-6により低下する傾向を示した。Eotaxinの生産量はH-Baer-2により低下し、Marangani

表1 キノア葉部抽出物添加による各種サイトカイン生産量の変化

Cytokine	H-Baer-2	R-Baer-2	R-NL-6	R-Marangani
IL-1 α				
IL-1 β				
IL-2			↓↓	
IL-3	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
IL-4				
IL-5	ND	ND	ND	ND
IL-6		↓		
IL-9				
IL-10		↓		↓↓
IL-12 (p40)				
IL-12 (p70)				
IL-13				
IL-17	↓↓		↓	
Eotaxin	↓↓			↓
G-CSF				
GM-CSF				
IFN- γ				
KC				
MCP-1				
MIP-1 α				
MIP-1 β				
RANTES				
TNF- α	↓	↓	↓↓	

n=3, ND: Not Detect, ↓ ↓ : p<0.05, ↓ : p<0.1, Blank : No Significant difference

により 34% 低下する傾向を示した。TNF- α の生産量は R-NL-6 により生産量は 39% 低下し、H-Baer-2 および R-Baer-2 により低下する傾向を示した。低下量は各々 35% 及び 34% であった。その他の測定したサイトカイン類では、生産量に変化は認められなかった。

考察

Baer-2, NL-6, RU-2 の熱水抽出物は、腸管上皮モデル系において、肥満細胞のモデルである RBL-2H3 の TNF- α 発現量は低下した。これらの抽出物は腸管上皮モデル細胞である Caco2 の粘膜上皮側に添加されている。さらにマクロファージモデル細胞である RAW264.7 を用いた同様の腸管上皮モデル系においては、NL-6 およ

び Marangani において、TNF- α の発現量は低下する傾向を示した。さらに RAW264.7 の上清を用いた免疫アッセイでは NL-6 の TNF- α の生産量は LPS 刺激による生産量に比べて低下し、H-Baer-2 および Baer-2 は低下する傾向を示し、TNF- α 発現量とは異なる結果となった。これは、発現量は TNF- α の発現時の測定であるのに対し、免疫アッセイによる TNF- α 生産量は、生産による蓄積も測定している事によると考えられ、各試料による添加後の Caco2 通過性の違いや、RAW264.7 での各遺伝子の発現抑制持続時間などが異なっている可能性が考えられた。TNF- α は代表的な炎症性サイトカインの 1 つであり、主にマクロファージ、T 細胞、B 細胞、肥満細胞などから産生される。TNF- α は細胞接着分子の

発現やアポトーシスの誘導、炎症メディエーターや形質細胞による抗体産生の亢進を行うことによりにより感染防御や抗腫瘍作用に関与する¹¹⁾。しかし、TNF- α の過剰な発現は関節腔では関節リウマチ、腸管では潰瘍性大腸炎やクローン病など様々な炎症性疾患を引き起こす。潰瘍性大腸炎の症状は下血を伴うまたは伴わない下痢とよく起こる腹痛である¹²⁾。クローン病は消化管のどの部位にも炎症や潰瘍が起こるが、小腸と大腸を中心として特に小腸末端部が好発部位とされている。症状は腹痛や下痢、血便、体重減少などである。これらの疾患はTNF- α の発現を抑制することで症状の緩和が期待できるとされている。日本では可溶性TNF- α への結合・中和などの作用を持つ抗体製剤であるインフリキシマブが使用されている¹²⁾。また、Baer-2では内因性の発熱因子であるIL-6を低下させる傾向を示し、H-Baer-2はIL-6の発現を誘導するIL-17の発現を低下させた。IL-6もTNF- α 同様炎症に関与するサイトカインであり、IL-6の増加は自己免疫疾患や炎症性疾患の発症に関与していると報告され、IL-6受容体の抗体は関節リウマチの治療薬として用いられている¹³⁾。また、IL-17は炎症疾患形成に重要な役割をもち、マクロファージにおいては炎症を促進するIL-1bやTNF- α の発現誘導に関与している¹⁴⁾。これらの事は、TNF- α やIL-1への影響などを通じて、IL-17生産量の低下が炎症の抑制に関与する事を示している。IL-3の生産量は測定した全てのキノア葉部抽出部により低下した。IL-3は、さまざまな前駆細胞の分化や増殖を促進すると共に、成熟肥満細胞への増殖や活性化された際のヒスタミン放出の促進作用を有している¹⁴⁾。これらの事は、IL-3の生産量が低下する事により、腸管上皮でのヒスタミン放出の抑制による炎症抑制に関与する可能性を示していると考えられる。IL-10はMaranganiで低下し、Baer-2では低下する傾向を示した。IL-10は抗炎

症性サイトカインであり、マクロファージでのIL-1, IL-12, TNF- α などの産生を抑制する^{15, 16)}。MaranganiでIL-10の生産量が低下すると共に、TNF- α の生産量に+LPSとの差を認めなかった。これはMaranganiにおいて、IL-10の生産量低下がTNF- α の生産量の維持をもたらした可能性がある。しかし、IL-1, IL-12, TNF- α の生産量は上昇していない事から、炎症性に大きな影響を与えなかったと考えられる。IL-9はLPS刺激を行った試料と刺激を行わなかった試料で差を認めなかった。これは、IL-9が主にT細胞や好中球、好酸球により産生されるサイトカインであり¹⁷⁾、RAW264.7では生産量が少なかった事が要因と考えられる。

本研究で使用した全てのキノア葉部抽出物は、対照群に対して炎症性サイトカイン類の発現量や生産量を有意に上昇させる事は無かった。この事は、キノア葉部抽出物は炎症の増悪や発症を促進する可能性は、非常に低い事を示している。これらの事から、キノア葉部抽出物は経口投与による腸管などでの炎症抑制に効果を有する事が期待出来ると考えられた。しかし品種や抽出方法によりTNF- α 発現量や生産量は異なった。同様にIL-2やIL10, IL17, Eotaxinなどでも生産量が異なっていた。これは、キノアの品種や抽出方法により得られる抽出分中の成分も異なり、炎症に係わるサイトカイン類への機能が異なっていると考えられた。また、本研究は細胞を用いたモデル系であり、肝臓などの代謝器官による影響は考慮されていない。今後、品種や抽出溶媒による活性の変化、動物実験などの検討を行う事により、より詳細な抗炎症性との関係を明らかにする事が出来ると期待される。

参考文献

- 1) Weber, J. E., The Inca's ancient answer to food storage, *Nature*, **272**, 486 (1978).

- 2) Coulter, L. and Lorenz, K., Quinoa: Composition, Nutritional value, food applications. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **23**, 203-207, (1990).
 - 3) Koziol, M. J., Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Food Comp. Anal.*, **5**, 35-68, (1992).
 - 4) Ruales, J. and Nair, B., Nutritional quality of protein in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods Human Nutr.*, **42**, 1-11, (1992).
 - 5) 小西洋太郎ら, 特集アマランスとキノア, 食の科学 **253**, 17-58, (2002).
 - 6) 小西洋太郎, 擬穀物アマランス, キノアの栄養特性とアレルギー代替食品への応用, 日本栄養・食糧学会 **55**, 299-302, (2002).
 - 7) 廣瀬裕子ら, 山梨県産キノアの葉に含まれる機能性成分の探索, 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集 **54**, 130-132, (2010).
 - 8) 上野川修一ら, 生物化学実験法 50 腸管細胞機能実験法, 学会出版センター, (2005).
 - 9) Itoh T., Oyama M., Takimoto N., Kato C., Nozawa Y., Akao Y., Inuma M. Inhibitory effects of sesquiterpene lactones isolated from *Eupatorium chinense* L. on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice., *Bioorg Med Chem.*, **17**, 3189-3197, (2009).
 - 10) Ralph P and Nakoinz L., Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS., *J Immunol.* **119**, 950-954., (1977)
 - 11) 菅村和夫, 宮園浩平, 宮澤恵二, 田中伸幸 / 編, サイトカイン・増殖因子, p.117-119, 羊土社, (2008)
 - 12) 福井次矢 / 監訳, デビッドソン内科学, p.971-979, 医歯薬出版, (2014)
 - 13) 橋詰美里, 大杉 義征, IL-6 の多様な作用, 日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*) **144**, p.172-177 (2014)
 - 14) 菅村和夫, 宮園浩平, 宮澤恵二, 田中伸幸 / 編, サイトカイン・増殖因子, p.21-45, 羊土社, (2008)
 - 15) Opp MR, Smith EM, Hughes TK., Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep., *Journal of Neuroimmunology.* **60**, 165-168, (1995).
 - 16) Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G., Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10., *Journal of Immunology.* **160**, 5936-5944, (1998).
 - 17) Ritobrata Goswami and Mark H. Kaplan, A Brief History of IL-9., *J Immunol.*, **186**, 3283-3288, (2011).
- (よしはら ゆうき 生活科学研究専攻 平成 30 年 3 月修了)
 (いそべ かつたか 日本大学生物資源科学部 准教授)
 (たかお てつや 生活機構学専攻 教授)
- 受理年月日 2018 年 10 月 1 日**
審査年月日 2018 年 11 月 30 日