

受託研究報告書

「海藻堆積物由来物質の抗アレルギー作用と安全性に関する研究」

平成 24 年 4 月

独立行政法人医薬基盤研究所

研究の概要

【受託研究の題目】

海藻堆積物由来物質の抗アレルギー作用と安全性に関する研究

【受託研究の目的及び内容】

海藻堆積物由来物質の健康食品や医薬品としての応用の可能性を探ることを目的に、当該物質をマウスに摂食させた際の抗アレルギー効果、および安全性に関する試験を行う。

【研究の実施期間】

平成 23 年 2 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

【研究委託者】

株式会社クリエイト
代表取締役社長 豊増康生
佐賀県鳥栖市幸津 923-3

【研究実施責任者】

独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト
プロジェクトリーダー 角田慎一

【研究協力者】

大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野
教授 堤 康央

報告書

試験の概要

本研究は、(株)クリエイトにおいて調製された海藻堆積物由来物質の健康食品や医薬品としての応用の可能性を探ることを目的に、当該物質の安全性、および抗アレルギー作用についてマウスを用いた実験により評価した。本目的にしたがって、下記の試験を実施した。

1. 海洋堆積物由来物質の安全性の評価（1）（24時間経口投与による急性毒性）
2. 海洋堆積物由来物質の安全性の評価（2）（4週間経口投与による亜急性毒性）
3. 海洋堆積物由来物質の抗アレルギー作用の評価（アトピー性皮膚炎モデル）

各試験の詳細

1. 海洋堆積物由来物質の安全性の評価（1）（24時間経口投与による急性毒性）

【目的】

海洋堆積物由来物質をマウスに24時間摂食させた際の生体影響（急性毒性）を、主要な生化学的マーカーにより評価する。

【試験材料等】

- ・マウス
Balb/c 系統、オス、6週齢、体重約20g、SPFグレードのマウスを日本SLC社より購入した。
- ・試料
クリエイト社より提供された海洋堆積物由来物質（CRと表記）粉末（H23.4.2受領分）を、あらかじめγ線照射滅菌（30kGy、コーガアイソトープ社にて）して使用した。
- ・通常食飼料
滅菌済み粉末飼料（CRF-1、オリエンタル酵母社）を使用した。

【試験方法】

- ・試験は医薬基盤研究所 SPF 動物実験施設において実施した。
- ・通常食飼料、あるいは通常食飼料に海洋堆積物由来物質（CR）を一定割合で混合（10w/w%、5%、2.5%）した飼料を、給餌缶（RodentCafe、オリエンタル酵母社）に入れて飼育ケージに配置し、マウスに自由摂食させた（5匹/群）。
- ・1匹あたりの総摂食量は24時間後の給餌缶の重量減少分を5で除した値とした（CRの

投与量としては、混合比に基づいて、摂食量の 10%, 5%, 2.5%)。

- ・ 24 時間給餌の後、体重測定および、エーテル麻酔下で眼窩静脈より採血し、血液生化学マーカー測定に供した。測定には血液を遠心分離して回収した血清を使用し、自動分析装置（富士ドライケム 7000、富士フィルム社）を使用した。また、安楽死後に開腹し、主要臓器の外観等を観察した。

・ 評価項目

体重

主要臓器の外観観察（ホルマリン固定にて保存）

主要な血液生化学マーカー値

AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、GOT）、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ、GPT）、tBIL（総ビリルビン）、BUN（尿素窒素）

【結果】

- ・ 測定結果は別紙 Fig.1～Fig.6 に記載の通り。
- ・ 経口投与はゾンデ等の定量的な投与器具の使用が一般的ではあるが、CR 粉末を水に懸濁するとゾンデの管に詰まり投与できないことから、自由摂食による投与で試験を行った。
- ・ 飼料の 1 匹あたりの総摂食量は 24 時間で 1.6～2.2g であり、CR の混合率による摂食量への影響は認められなかった。これに基づき、CR の 1 匹あたり 24 時間の摂食量は 10% 群で 0.15g、5% 群で 0.1g、2.5% 群で 0.05g（マウスの体重 20g として、7.5g/kgbw、5g/kgbw、2.5g/kgbw）であった（Fig. 1）。
- ・ 体重変化について、各群間で大きな違いは認められなかった（Fig. 2）。
- ・ 24 時間時点でのマウスの行動・外観、あるいは開腹時の肝臓、腎臓、脾臓等に外観上目立った変化は認められなかった。
- ・ 肝機能障害のマーカーとして AST, ALT, tBIL 値を、腎機能障害のマーカーとして BUN 値を測定したが、いずれの群においてもコントロール群と比べて有意な変化は認められなかった。（なお AST 値について、採血時に明らかに溶血したサンプルでは不正確な値となるため該当サンプルは除外した）（Fig.4～6）。
- ・ 以上の結果から、CR 粉末 0.15g/mouse（マウスの体重 20g として、7.5g/kg）までの投与（摂食）量において、急性毒性（24 時間）は認められなかった。

2. 海洋堆積物由来物質の安全性の評価 (2) (4週間経口投与による亜急性毒性)

【目的】

海洋堆積物由来物質をマウスに4週間摂食させた際の生体影響(亜急性毒性)を、主要な生化学的マーカーにより評価する。

【試験材料等】

・マウス

Balb/c 系統、オス、6週齢、体重約20g、SPFグレードのマウスを日本SLC社より購入した。

・試料

クリエイト社より提供された海洋堆積物由来物質粉末(H23.4.2受領分)を、あらかじめ γ 線照射滅菌(30kGy、コーガアイソトープ社にて)して使用した。

・通常食飼料

滅菌済み粉末飼料(CRF-1、オリエンタル酵母社)を使用した。

【試験方法】

・試験は医薬基盤研究所SPF動物実験施設において実施した。

・通常食飼料、あるいは通常食飼料に海洋堆積物由来物質(CR)を一定割合で混合(10w/w%、5%、2.5%)した飼料を、給餌缶(RodentCafe、オリエンタル酵母社)に入れて飼育ケージに配置し、マウスに自由摂食させた(5匹/群)。

・給餌缶の重量減少を経日的に計測し、1匹あたり、1日の摂食量を概算した(CRの投与量としては、混合比に基づいて、摂食量の10%、5%、2.5%)。

・4週間の給餌の後、エーテル麻酔下で眼窩静脈より採血し、血液生化学マーカー測定に供した。測定には血液を遠心分離して回収した血清を使用し、自動分析装置(富士ドライケム7000、富士フィルム社)を使用した。また、安楽死後に開腹し、主要臓器の外観等を観察した。

・評価項目

体重

主要臓器の外観観察(ホルマリン固定にて保存)

主要な血液生化学マーカー値

AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、GOT)、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ、GPT)、tBIL(総ビリルビン)、BUN(尿素窒素)

【結果】

・測定値は別紙Fig.7~Fig.12に記載の通り。

- ・24時間投与試験と同様に、自由摂食による投与で試験を行った。
- ・飼料の1匹あたりの1日摂食量は、急性毒性試験の場合とほぼ同量、平均1.6gであった。それに基づき、CRの1匹あたりの1日摂食量は10%群で約0.16g、5%群で0.08g、2.5%群で0.04g、(それぞれ8g/kgbw、4g/kgbw、2g/kgbw)、4週間でのCR総摂食量は、10%群で4.4g、5%群で2.2g、2.5%群で1.1gであった (Fig.7)。
- ・体重変化について、各群間で大きな違いは認められなかった (Fig.8)。
- ・実験期間中のマウスの行動・外観、あるいは4週間(28日)での開腹時の肝臓、腎臓、脾臓等に外観上目立った変化は認められなかった。
- ・肝機能障害のマーカーとしてAST, ALT, tBILを、腎機能障害のマーカーとしてBUNを測定したが、いずれの群においてもコントロール群と比べて有意な変化は認められなかった。(なおAST値について、採血時に明らかに溶血したサンプルでは不正確な値となるため該当サンプルは除外した) (Fig.9~12)。
- ・以上の結果から、4週間の経口投与において、CR粉末0.16g/mouse/day (8g/kgbw/day)までの投与(摂食)量では亜急性毒性は認められなかった。

3. 海洋堆積物由来物質の抗アレルギー作用の評価 (アトピー性皮膚炎モデル)

【目的】

海洋堆積物由来物質の抗アレルギー作用の有無を、アトピー性皮膚炎のモデルであるダニ抗原誘発皮膚炎マウスで評価する。アレルギー症状の指標として、投与局所である耳介の肥厚、局所サイトカイン量を測定する。

【試験材料等】

・マウス

NC/Nga 系統、雄性、6 週齢、SPF グレードのマウスを日本 SLC より購入し、1 週間の慣らし飼育後に実験を行った。マウスの耳介皮内に、ダニ抗原 (Dp: mite allergen extract, *Dermatophagoides pteronyssinus*, コスモバイオ社) を反復接種することでアトピー性皮膚炎様病態を発症させた。

・試料

クリエイト社より提供された海洋堆積物由来物質粉末 (H23.4.2 受領分) を、あらかじめ γ 線照射滅菌 (30kGy、コーガアイソトープ社にて) して使用した。抗アレルギー作用の陽性コントロールとしてプレドニゾロンを投与した。

・通常食飼料

滅菌済み粉末飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母社) を使用した。

【試験方法】

- ・試験は医薬基盤研究所 SPF 動物実験施設において実施した。
- ・アトピー性皮膚炎モデルとして、ダニ抗原 (Dp: mite allergen extract, *Dermatophagoides pteronyssinus*, コスモバイオ社) を、ペントバルビタール麻酔下でマウス両耳介部皮内に $2.5 \mu\text{g}/\text{site}$ 接種し、皮膚炎を誘発した。接種は週 2 回計 6 回 (day0, 3, 7, 10, 14, 17) 行った。各接種の 24 時間後にシクネスゲージ (G-7C、尾崎製作所) で耳介の肥厚を測定するとともに、体重を測定した。
- ・通常食飼料、あるいは通常食飼料に海洋堆積物由来物質 (CR) を一定割合で混合 (10w/w%、5%、2.5%) した飼料、また抗炎症作用のコントロールとしてプレドニゾロンを混合 (0.0125%) した飼料を、給餌缶 (RodentCafe、オリエンタル酵母社) に入れて飼育ケージに配置し、マウスに自由摂食させた (5 匹/群)。なお、プレドニゾロン投与群では体重減少が認められたため、day8~10 の 3 日間休薬し、通常食を与えた。
- ・給餌缶の重量減少を経日的に計測し、1 匹あたり、1 日の摂食量を概算した (CR の投与量としては、混合比に基づいて、摂食量の 10%、5%、2.5%)。
- ・Dp 最終接種の 24 時間後 (day18) にペントバルビタールで深麻酔し、眼窩静脈より末梢血を採血し、血清を回収して抗体価測定に供した。また、安楽死後に耳介を切除し、一

部は迅速凍結して局所サイトカイン測定に、一部は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、組織病理学的評価 ((株)アプライドメディカルリサーチ、大阪市) に供した。

- ・局所サイトカイン測定： -80℃で凍結保存していた耳介を組織溶解液 (Cell Extraction Buffer, Invitrogen 社、両耳耳介/4mL) に浸し、ホモジナイザー (Ultra Turrax T25, IKA 社) により粉碎可溶化した。遠心により不溶物を除いた上清を測定サンプルとし、総タンパク質量を BCA 法(BCA Protein Assay, Pierce 社)により測定した。各種サイトカイン (IL-2, IFN- γ , IL-4) の測定は、BioPlex サスペンションアレイシステム (BioRad 社) を用い、メーカーのプロトコルに準じて行った。IL-6 の測定には ELISA キットを用いた (Mouse IL-6 ELISA kit, BD Biosciences 社)。

【結果】

- ・各測定値は別紙 Fig.13~Fig.19 に記載の通り。
- ・飼料の 1 匹あたりの 1 日摂食量は、平均 1.3g であった。それに基づき、CR の 1 匹あたりの 1 日摂食量は 10%群で約 0.13g、5%群で 0.065g、2.5%群で 0.033g、(それぞれ 5.2g / kgbw、2.6g / kgbw、1.3g / kgbw)、プレドニゾロンの摂食量は 1 匹 1 日あたり 0.16mg (6.4mg / kgbw) であった。
- ・抗原感作局所 (耳介) の肥厚測定の結果、day11 以降、CR 摂食群で通常食群と比べて統計的に有意な肥厚の減少が認められた (Fig.13)。
- ・体重変化について、CR 投与群では通常食群と差は認められなかった。一方、プレドニゾロン投与群では今回の投与量において体重減少が認められた (Fig.14)。
- ・病理組織学的検査の結果、表皮の肥厚に関して、Dp 感作群と比べて CR 10%投与群では肥厚が抑制される傾向にあった。表皮層および真皮層での炎症性細胞の浸潤に関して、Dp 感作群に比べて CR10%投与群でやや抑制の傾向が認められた (Fig. 15)。
- ・抗原感作局所のサイトカインレベルを測定した結果、主要な炎症性サイトカインである IL-6 レベルは Dp 感作により上昇し、CR の投与群、およびプレドニゾロン投与群では IL-6 レベルの上昇は抑えられていた (Fig.16)。Th2 タイプのサイトカインである IL-4 は、Dp 感作により上昇が認められ、アレルギーの特徴的な病態を呈していた。プレドニゾロン投与群では IL-4 レベルの上昇は抑えられていたが、CR の投与群では差は認められなかった (Fig.17)。Th1 タイプのサイトカインである IL-2, IFN- γ レベルは低値であり、各群で顕著な差は認められなかった (Fig.18, 19)。
- ・以上の結果から、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて、CR の経口投与により炎症反応を軽減しうる可能性が示された。今後ヒトへの適用を検討するには、再現性の試験や異なる病態モデルでの検証も必要と考えられる。また、本研究で認められた炎症抑制作用の機序は不明であり、有効成分の特定、分子メカニズムの解明が期待される。腸内細菌叢に与える影響なども興味あるところである。

Fig. 1

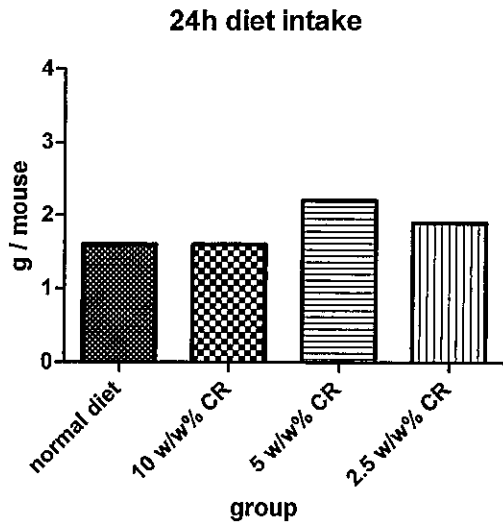


Fig. 2

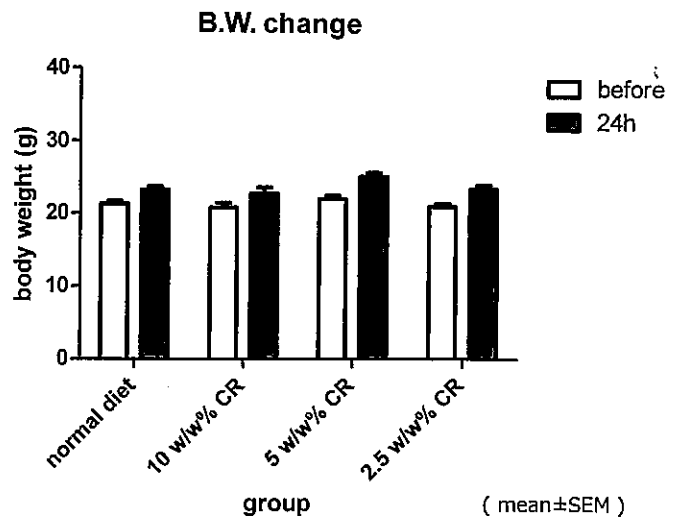


Fig. 3

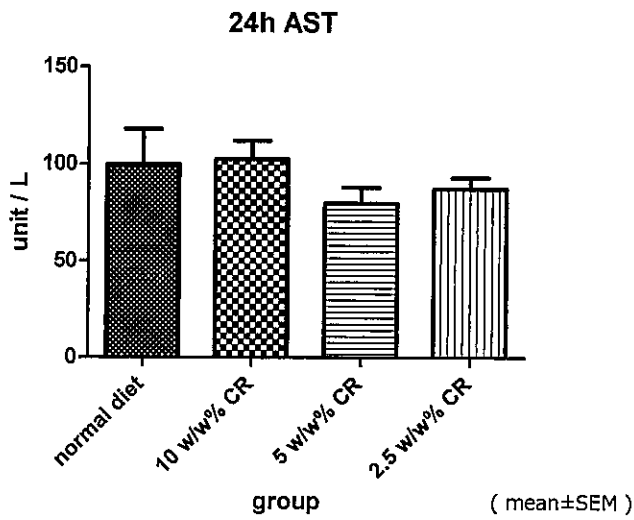


Fig. 4

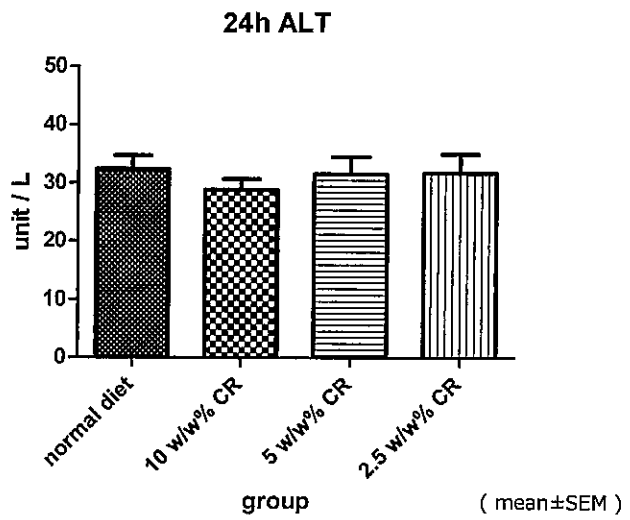


Fig. 5

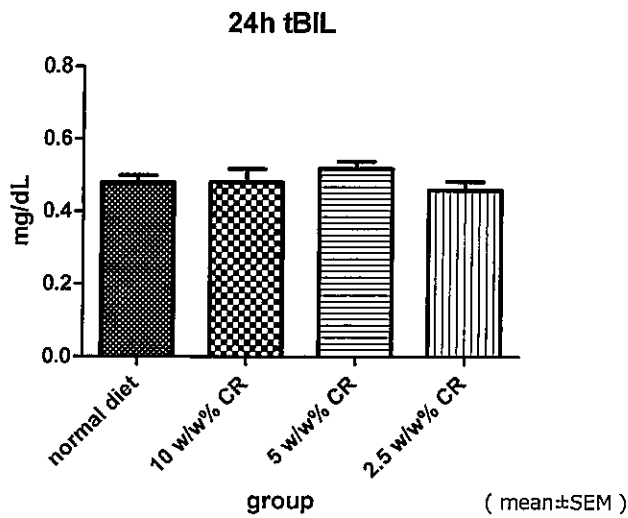


Fig. 6

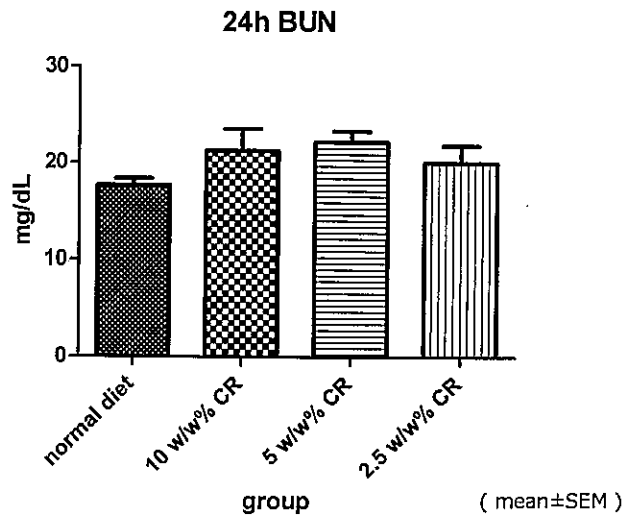


Fig. 7

4week diet daily intake
(ave. 1.6 g / day / mouse)

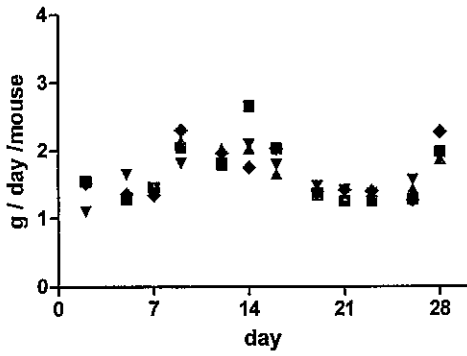
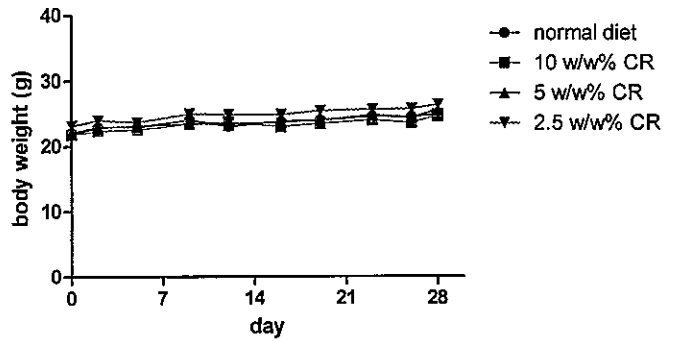


Fig. 8

4week B.W. change



(mean±SEM)

Fig. 9

4week AST

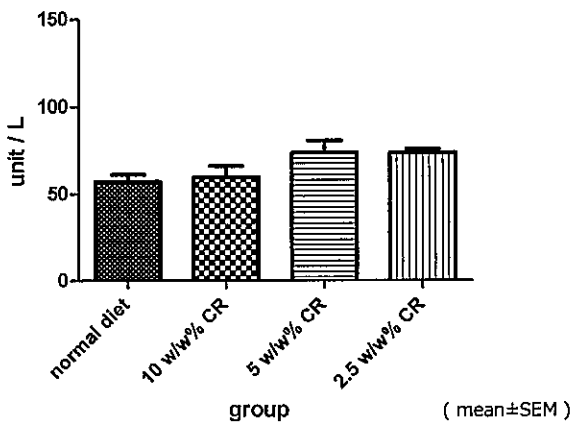


Fig. 10

4week ALT

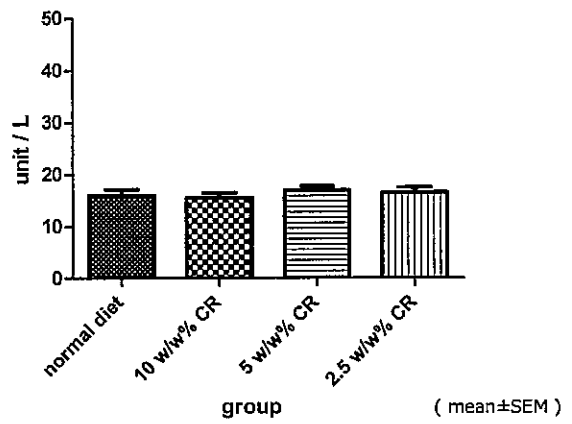


Fig. 11

4week tBIL

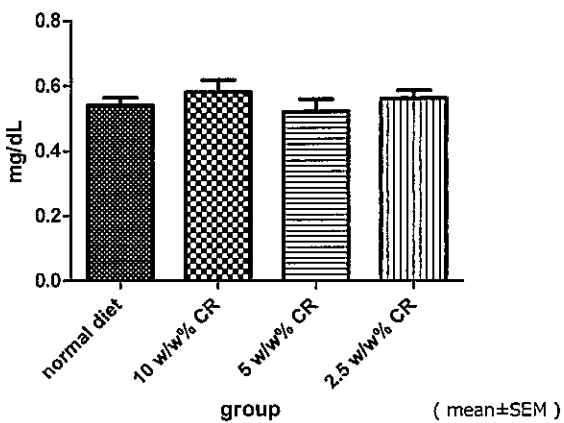


Fig. 12

4week BUN

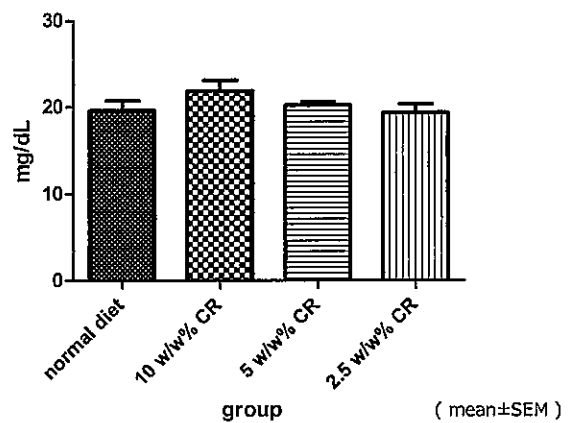


Fig.13

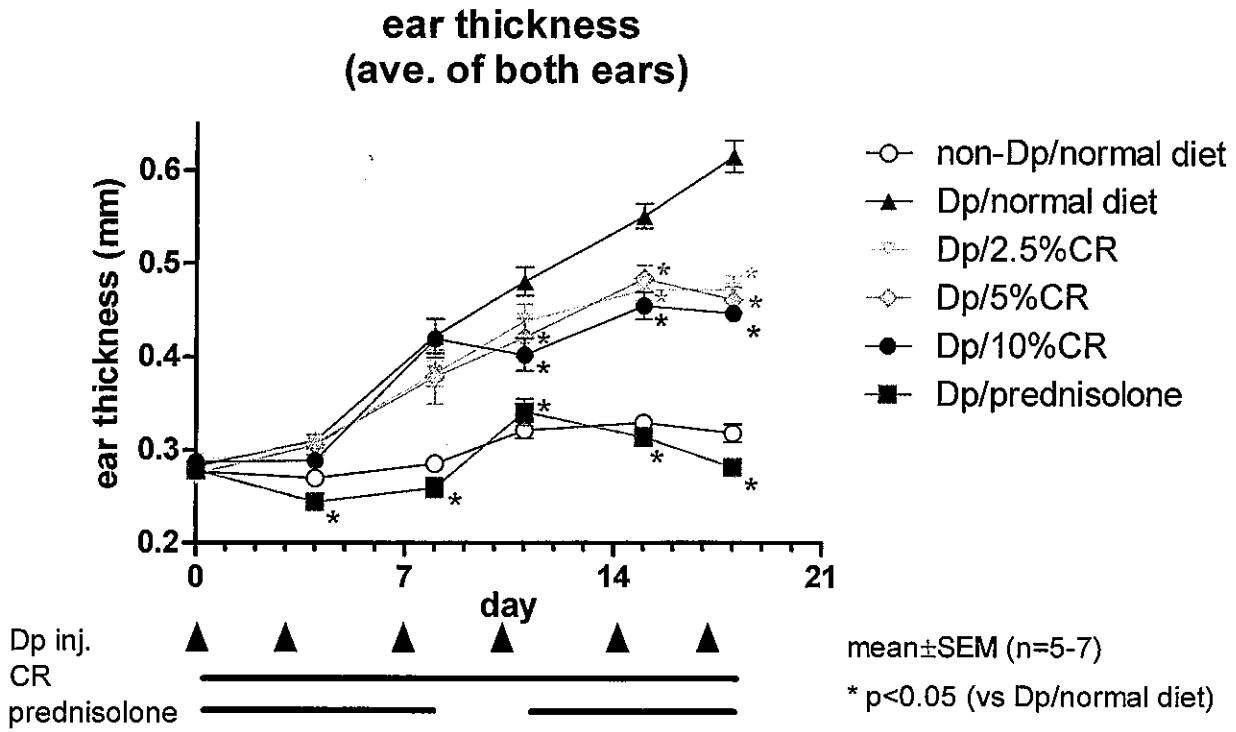
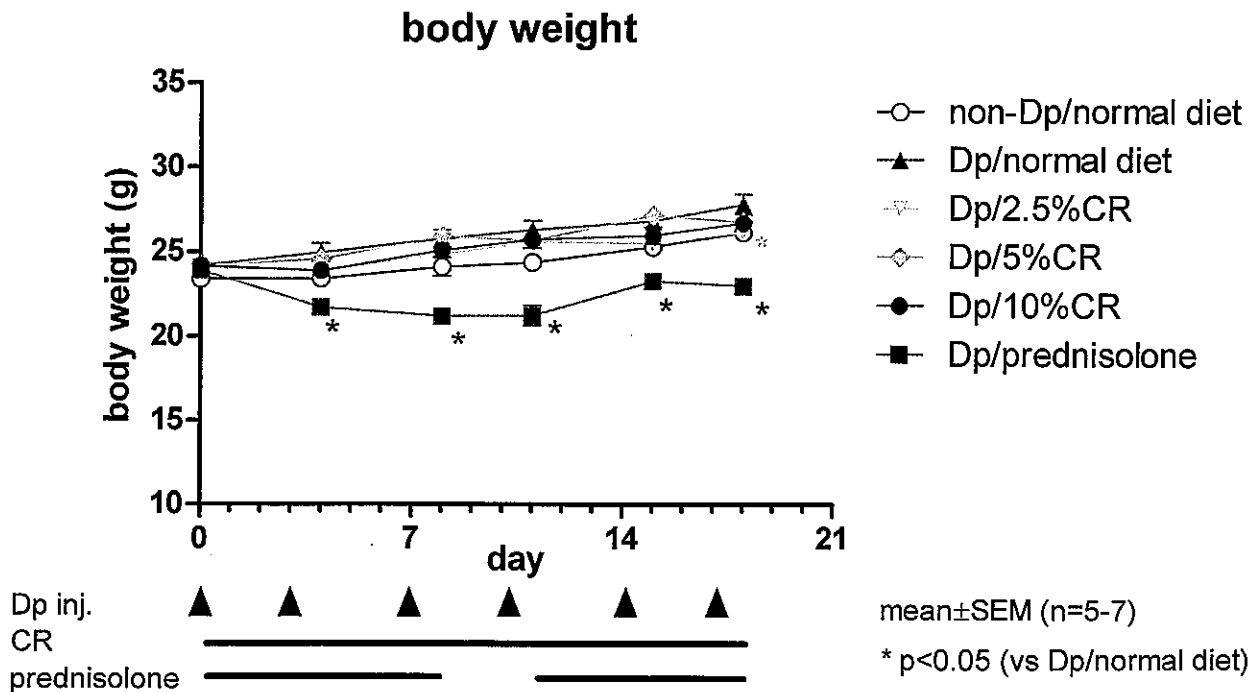


Fig.14



結果

	未処置正常			抗原感作・薬物非投与			抗原感作・薬物投与			抗原感作・薬物投与			抗原感作・薬物投与									
	1-1	1-2	3-1	3-2	3-3	3-4	4-1	4-2	4-3	4-4	5-1	5-2	5-3	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4	7-1	7-2	7-3	7-4
表皮層	0	0	0	2	0	3	3	1	0	0	2	0	3	3	0	0	0	0	1	0	0	0
真皮層	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
真皮層	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
真皮層	0	0	1	2	2	3	3	3	0	3	1	2	2	3	0	1	2	1	0	0	0	0
炎症性細胞浸潤	0	0	0	2	0	2	2	1	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0
真皮層	0	0	3	3	4	4	4	4	3	3	3	3	4	4	3	3	3	3	1	2	1	1
浮腫	0	0	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0
細胞芽細胞増生	0	0	0	0	3	0	3	0	0	3	0	0	0	3	3	2	2	2	0	0	0	0
皮下組織	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	0	2	1	1
耳介軟骨	0	0	0	0	2	0	2	0	2	3	0	1	0	2	3	0	2	2	0	0	0	1

Grade 0:なし 1:極軽度 2:軽度 3:中等度 4:高度

群番号	処置
1	未処置正常マウス
3	Dp 抗原感作/通常飼料
4	Dp 抗原感作/2.5% CR 含有飼料
5	Dp 抗原感作/5% CR 含有飼料
6	Dp 抗原感作/10% CR 含有飼料
7	Dp 抗原感作/ブレドニゾン0.0125%含有飼料

Fig.16

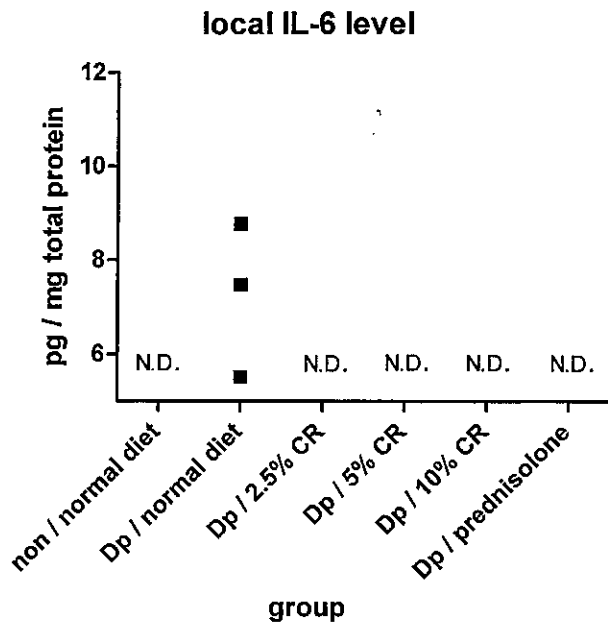


Fig.17

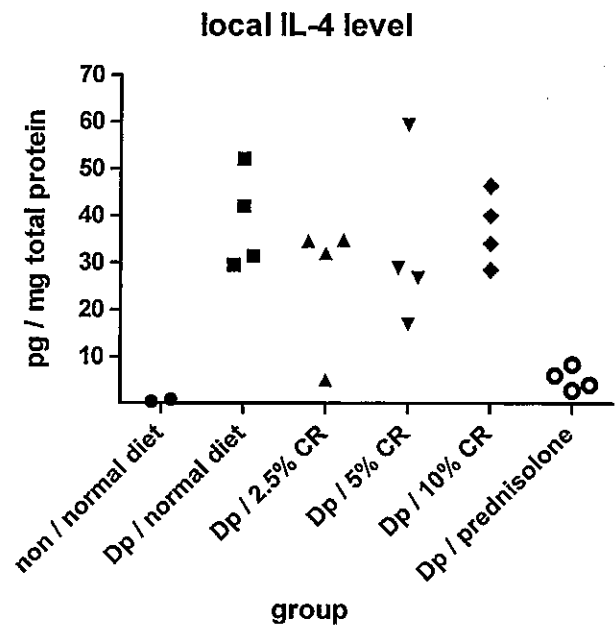


Fig.18

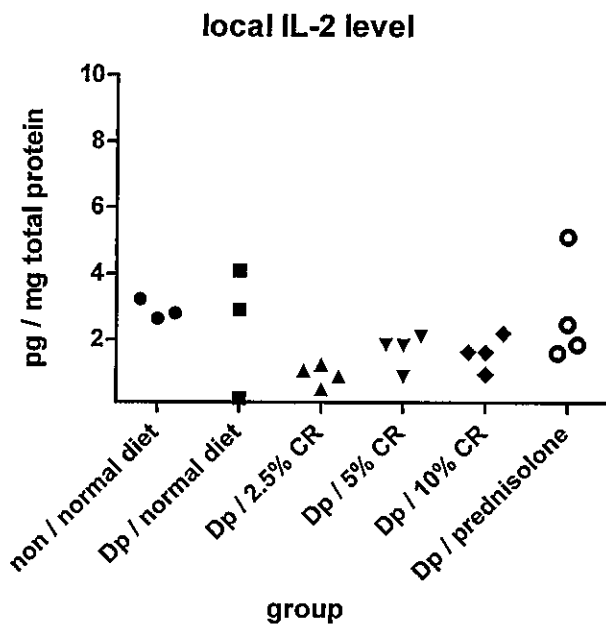


Fig.19

