

炎症性腸疾患における寛解維持のための 脂質ナノエマルジョンの開発

山崎 正夫

宮崎大学農学部応用生物科学科 准教授

緒言

炎症性腸疾患 (IBD) は主として若年層に好発する疾患であり、現在約15万人の患者が存在すると推定されている。本疾患は厚生労働省より難病指定を受けており、発症の要因が不明であることから発症予防の観点からの研究が極めて困難である。本疾患は下痢、血便、腹痛を主症状としており、罹患者の生活の質は著しく低下し、低脂肪、低刺激食を基本とした食事制限が求められることも多い。本疾患は日本において爆発的に増加傾向にあり、今後ますます大きな健康問題となることが懸念される。従来、本疾患の患者に対してはステロイド剤などが処方されてきたものの、幅広い副作用や不十分な有効性からその使用には問題点も多い。

このような背景から、機能性食品分野の観点から大きく貢献できるのは『再燃の防止、寛解の維持』あるいは『新規な発症の防止』であると考えた。筆者はこの手段として、機能性脂質の有用性に着目した。筆者はナノエマルジョン化した共役リノール酸 (CLA) が抗炎症性を持つことを示してきているが、本疾患の予防あるいは寛解維持の観点からはさらなるエビデンスの蓄積が求められる。さらに、 γ -リノレン酸 (GLA) の抗炎症作用についても示唆しているが、 γ -リノレン酸とIBDの関連はほとんど明らかとされていない。本研究では、CLA ナノ粒子とGLAの抗IBD作用を評価するとともに、*in vitro*での腸管炎症モデル構築によって、脂肪酸の抗炎症性を網羅的に解析する。

方法

CLA ナノエマルジョンの調製

トリグリセリド型CLA (CLA-TG) を予備乳化後、溶液を高圧力で $3.0\ \mu\text{m}$ 、 $0.8\ \mu\text{m}$ の順にSPG膜に通し、粒子の微細化を行った。平均粒径が約 $700\ \text{nm}$ になったところで溶液を高圧力でAnodisc47の $0.2\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.02\ \mu\text{m}$ の膜に順次通し、粒子径を動的光散乱式粒度分

布測定計で測定した。透析により乳化剤として用いたコール酸を除去後、エマルジョンの粒径とゼータ電位を測定した。

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎モデル

本実験は、宮崎大学動物実験に関する指針の「動物福祉」に関する項目、すなわち「第7：実験動物の管理」、「第8：実験操作」および「第9：実験終了後の処置」に従って行った。CLA試験において、予備飼育後、Control群 ($n=4$)、DSS群 ($n=8$)、CLA ナノエマルジョン+DSS群 ($n=7$) の3群に分け、Control群にはPBS、DSS群にはナノエマルジョンの外水相、CLA ナノエマルジョン+DSS群には $90\ \text{nm}$ CLA ナノエマルジョン ($0.77\ \text{mg/g}$) を1日おきに計10回経口投与した。投与開始8日後より飲水を3%DSS含有水に切り替え、10日間自由飲水させた。体重、糞便スコア、潜血スコアの測定を1日おきに行った。糞便の状態を表す糞便スコアは(0；正常な便、1；形のある軟便、2；形の崩れた軟便、3；下痢)、血便の状態を表す潜血スコアは(0；潜血なし、1；潜血あり、2；出血跡あり、3；常に出血)として測定をした。スコア化はWirtzらの論文を参考にした¹⁾。GLA試験において、8週齢雄のBALB/cマウスを予備飼育後、サフラワー群 ($n=3$)、サフラワー+DSS群 ($n=11$)、ボラージ群 ($n=4$)、ボラージ+DSS群 ($n=12$) の4群に分け、サフラワー群、サフラワー+DSS群にはサフラワー食、ボラージ群、ボラージ+DSS群にはボラージ食を3週間自由摂食させた。摂食開始から1週間後、飲水を3%DSS含有水に切り替え、1週間自由飲水させた。本実験でも前述の通り病状のスコア化を行った。大腸における脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにより測定した。

In vitro 腸管炎症評価

HT-29ヒト大腸ガン細胞をToll-like receptor (TLR)

5リガンドであるフラジェニンで刺激し、産生されるIL-8量をELISA法で測定した。HT-29細胞を 5.0×10^4 cells/cm²で播種し、種々の脂肪酸により24時間処理した後、さらにフラジェニン100 ng/mlと各脂肪酸の共処理により刺激し、上清中へのIL-8産生をELISA法により測定した。

結 果

CLA ナノエマルジョンの調製

筆者らの以前の結果から、CLA ナノエマルジョンは90 nm粒径のものが200 nm粒径のものに比べて抗炎症活性が強いことが明らかとなっている。そこで、本試験では粒径90 nm程度のCLA ナノエマルジョンを調製することを目標とした。今回得られたエマルジョンの平均粒径は 93.6 ± 0.4 nmで、以前に抗炎症性を認めたエマルジョン 89.4 ± 0.9 nmに近いものであった。また、本エマルジョンのゼータ電位は -11.3 ± 0.2 mVであった。

CLA ナノエマルジョンのIBDに対する作用

Control群と比較してDSS群において、8日目から有意に体重減少を示した(図1a)。CLA ナノエマルジョンの投与で体重減少の抑制傾向が見られた。糞便スコアについてはControl群と比較してDSS群において、4日目から増加を示し、8日目をピークにスコアの減少傾向がみられた。また、CLA ナノエマルジョンを処理するこ

とで、6日目に糞便スコアの有意な抑制がみられた(図1b)。潜血スコアについてはDSSを処理群で、2~4日目からスコアが増加し、8日目をピークにスコアの減少傾向がみられた。また、CLA ナノエマルジョン投与は潜血スコアに影響しなかった(図1c)。DSS大腸炎モデルにおいては大腸の短縮がみられ、大腸の長さが病態の指標として使用されている。そのため、実験終了時の大腸の長さを測定した。Control群と比較してDSSを群において、有意な大腸の短縮がみられた(図1d)。また、CLA ナノエマルジョン投与により、わずかに大腸短縮の抑制傾向がみられた。また、各種組織重量については肝臓と脾臓重量に有意な差は認められなかったが、Controlと比較してDSSを処理した群では睾丸周囲脂肪と腎周囲脂肪の有意な減少がみられた。次にCLA ナノエマルジョン投与によってCLAの大腸組織での蓄積を検討するため、大腸組織の脂肪酸組成を調べた。大腸組織中においてはCLA ナノエマルジョン処理によるCLA量の増加はみられず、*t10*, *c12*-CLAは検出されなかった。

ボラージ油摂取のIBDに対する作用

サフラワー+DSS群とボラージ+DSS群において有意な体重差はみられず、本試験においてはDSS投与による体重減少もみられなかった。糞便スコアはDSS投与で明確の上昇が認められ、疾患の発症が確認できた。投与9日目にスコアは最大となったが、投与期間を通じてサフラワー+DSS群と比較してボラージ+DSS群において、スコアが低い傾向がみられた(図2a)。潜血スコアについてはサフラワー+DSS群と比較してボラージ+DSS群において、5日目に有意な低値を示した(図2b)。病態の指標である大腸の長さには各群間で差はみられなかった。次にボラージ油摂取によるGLAの大腸組織や血中における蓄積を検討した(表1, 2)。大腸組織においてボラージ油を摂取した群ではサフラワー油を摂取した群

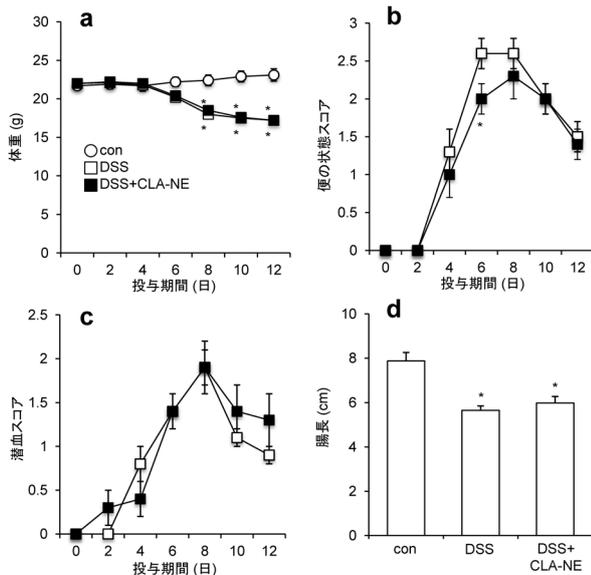


図1 CLA ナノエマルジョンがDSS誘導性炎症性腸疾患の病状に及ぼす影響
コントロール群に比べて有意差有り **p*<0.05

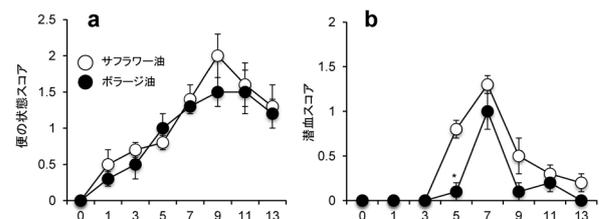


図2 ボラージ油がDSS誘導性炎症性腸疾患の病状に及ぼす影響
サフラワー群に比べて有意差有り **p*<0.05

表1 各脂質摂取が大腸脂肪酸組成に及ぼす影響

	サフラワー	ボラージ	サフラワー +DSS	ボラージ +DSS
脂肪酸 (重量%)				
パルミチン酸	18.9±0.1	16.7±1.0	16.5±1.3	16.1±1.2
パルミトレイン酸	4.7±0.6	3.0±0.4	3.6±0.9	3.8±0.6
ステアリン酸	7.0±1.0	9.0±0.5	8.3±1.5	10.0±1.2
オレイン酸	27.8±5.1	23.7±3.0	20.2±3.9	18.8±3.8
リノール酸	19.8±2.5 ^a	14.7±2.1 ^{ab}	17.9±2.2 ^a	9.2±1.0 ^b
GLA	0.0±0.0 ^a	1.2±0.4 ^b	0.1±0.0 ^a	1.3±0.2 ^b
DGLA	1.4±0.5 ^{ab}	3.8±0.6 ^c	1.2±0.3 ^b	2.7±0.3 ^{ac}
AA	5.3±1.1	8.3±1.2	7.3±1.3	10.0±1.4
DHA	0.8±0.1	1.1±0.2	1.5±0.3	2.0±0.3
Δ5不飽和化指標				
AA/(DGLA+AA)	0.78±0.08 ^{ab}	0.69±0.04 ^a	0.86±0.02 ^b	0.77±0.02 ^{ab}
Δ6不飽和化指標				
GLA/(LA+GLA)	0.00±0.00 ^a	0.09±0.03 ^b	0.01±0.00 ^a	0.13±0.02 ^b

共通のアルファベットを有さない群間に有意差有り (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

表2 各脂質摂取が血清脂肪酸組成に及ぼす影響

	サフラワー	ボラージ	サフラワー +DSS	ボラージ +DSS
脂肪酸 (重量%)				
パルミチン酸	14.7±1.8	15.4±0.1	13.4±0.5	13.9±0.7
パルミトレイン酸	0.7±0.1	0.7±0.2	0.7±0.0	0.8±0.1
ステアリン酸	9.3±0.5	9.7±0.5	11.2±0.6	11.1±0.6
オレイン酸	5.7±0.5	7.7±1.0	5.6±0.3	6.5±0.4
リノール酸	16.7±0.3 ^a	16.3±2.4 ^a	16.5±0.5 ^a	10.3±0.6 ^b
GLA	0.3±0.0 ^a	2.6±0.4 ^b	0.3±0.0 ^a	1.7±0.1 ^c
DGLA	0.8±0.0 ^a	2.0±0.2 ^b	0.9±0.0 ^a	1.3±0.1 ^c
AA	29.0±4.4 ^b	16.6±2.5 ^a	27.5±1.7 ^b	28.0±2.0 ^b
DHA	3.5±0.7	2.6±0.5	3.2±0.2	3.1±0.4
Δ5不飽和化指標				
AA/(DGLA+AA)	0.97±0.00 ^{ac}	0.89±0.01 ^b	0.97±0.00 ^a	0.95±0.01 ^c
Δ6不飽和化指標				
GLA/(LA+GLA)	0.02±0.00 ^a	0.14±0.00 ^b	0.02±0.00 ^a	0.14±0.00 ^b

共通のアルファベットを有さない群間に有意差有り (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

と比較してGLA量、ジホモγリノレン酸 (DGLA) 量が多く、アラキドン酸量 (AA) も多い傾向を示した。それに伴いΔ5不飽和化指標については低い傾向を示し、Δ6不飽和化指標については有意に高かった。血清においてボラージ油を摂取した群ではサフラワー油を摂取した群と比較してGLA量、DGLA量が多かった。それに伴い、Δ6不飽和化指標については有意に高かった。ボラージ群ではAA量が他の群より少なかった。

In vitroにおける脂肪酸の腸管炎症抑制作用

フラジェリン刺激 (100 ng/ml) によりHT-29細胞より産生されるIL-8量は3.3倍に増強され、炎症応答の誘導が確認された。脂肪酸濃度を細胞毒性の認められない50 μMに調製したところ、飽和脂肪酸、オレイン酸、リノール酸はIL-8産生に影響を与えなかった。これまで

抗炎症作用の報告されるEPA、DHAはIL-8産生を強く抑制しており、DHAは今回評価対象とした脂肪酸の中では最も強い活性を示した。興味深いことにGLAおよびその代謝物であるDGLA、AAについてもIL-8産生抑制作用が認められた。

考 察

CLAは抗炎症作用を有する脂肪酸としての報告があり、マクロファージにおけるLPS応答を抑制することが知られている²⁾。筆者らの以前の成果から、CLAの抗炎症作用はナノエマルジョンとしたものでも認められることが示されており、様々な病態におけるCLAナノエマルジョンの実質的な炎症抑制効果の検証が期待された。本試験ではDSS誘導性炎症性腸疾患に対する作用を検証した。炎症性腸疾患の病状はいくつかのパラメー

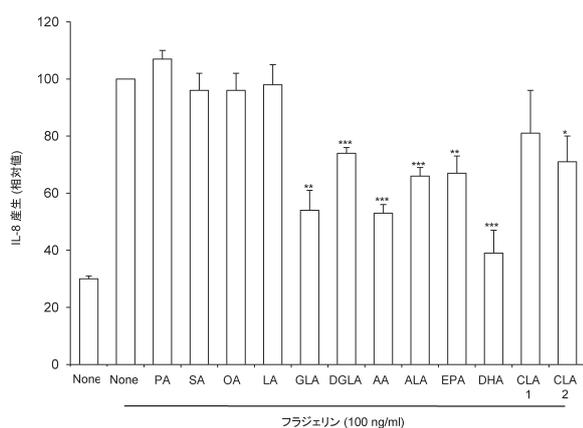


図3 HT-29細胞のIL-8産生に及ぼす脂肪酸の効果
フラジェリン+コントロール群に比べて有意差有り
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

PA; パルミチン酸、SA; ステアリン酸、OA; オレイン酸、LA; リノール酸、GLA; γ -リノレン酸、DGLA; ジホモ- γ -リノレン酸、AA; アラキドン酸、ALA; α -リノレン酸、EPA; エイコサペンタエン酸、DHA; ドコサヘキサエン酸、CLA1; 9c, 11t-共役リノール酸、CLA2; 10t, 12c-共役リノール酸

ターで表すことができるが、体重減少と腸長短縮に対してCLAナノエマルジョン投与は顕著な影響を与えなかった。便の状態や血便の状態についてはスコアの抑制傾向が認められ、一定の効果は認められた。しかしながら、CLAの摂取に炎症性腸疾患の症状抑制効果が報告されており^{3,4)}、ナノエマルジョン化による積極的なメリットは認められなかった。特に、大腸組織においてCLAの蓄積が明確には認められず、炎症部位への送達性向上が課題と考えられる。

GLAの抗炎症作用については、以前筆者らはマクロファージを用いた試験によってLPS応答を抑制することを示しており、他にも類似の報告が見られる⁵⁾。本研究で新たに腸管炎症モデルとしてHT-29細胞におけるTLR5応答を評価したところ、GLAはIL-8の産生を抑制

することが示され、腸管上皮細胞に対しても抗炎症性を有することが明らかとなった。さらに、その代謝物であるDGLA、AAも比較的高い抗炎症活性を有しており、GLAが生体内で代謝を受けた場合も抗炎症性が発揮されることが期待された。

そこで、GLAを高濃度で含有するボラージ油の摂取が炎症性腸疾患の病状におよぼす影響を検討した。その結果、摂取したGLAは血清、大腸に蓄積されており、その代謝物のレベルも増加していた。病状の改善効果については便の状態から判断すると、抑制傾向は認められた。一方で、本試験では実験終了時点でいずれの群の動物も寛解状態に近い程度に回復しており、GLAの効果も明確に評価するに至らなかった。このため、実験デザインについて一考が必要であり、さらに本モデルで現れる病状が脂肪酸組成や脂質メディエーターの変化によりどの程度の影響を受けるかについても明確とする必要がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご支援いただきました公益財団法人三島海雲記念財団に御礼申し上げます。また、ナノエマルジョンの調製にあたり技術的ご指導いただきました宮崎県工業技術センター、清水正高氏、山本建次氏、濱山真吾氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) S. Wirtz, et al.: *Nat. Protoc.*, **2**, 541-546, 2007.
- 2) Y. Iwakiri, et al.: *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **67**, 435-443, 2002.
- 3) J. Bassaganya-Riera, et al.: *Clin. Nutr.*, **31**, 721-727, 2012.
- 4) J. Bassaganya-Riera, et al.: *Gastroenterology*, **127**, 777-791, 2004.
- 5) C. S. Chang, et al.: *Inflammation*, **33**, 46-57, 2010.