

報 文

機能性食品 KGN が線虫の産卵, 成長および寿命に与える影響

長谷川浩一^{1, 2)}, 三輪さつき¹⁾, 三輪錠司^{2, 3)}¹⁾中部大学生物機能開発研究所, ²⁾日本学術振興会特別研究員, 京都大学大学院農学研究科³⁾中部大学応用生物学部

要 旨

100%天然素材(葉草)で構成された漢方系機能性食品 KIPPO(以下, KGN)は, 細胞の ATP 活性の向上および活性酸素の除去能力を向上する効果があり, ヒトの老化にともなって発症率の高くなる痴呆, リウマチ, 糖尿病, 癌など様々な病気の症状を改善する臨床例が報告されている. この KGN について, モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下, エレガンスとする)を使った効能評価をおこなった. エレガンスの生活上最適 pH である pH6 に調節した培地で, 2 種類の KGN 濃度処理(推奨摂取量である 2 袋/日, および 2 倍濃度である 4 袋/日)をおこなったところ, 産卵数, 成長, および寿命については無処理の Control と比べて有意な差が認められなかった. また, ヒトが摂取した場合における KGN 有効 pH である pH7 の培地においても, Control と比べて有意な差が認められなかった. 産卵が終了した 7 日目から KGN 処理をおこなった場合の寿命も, Control との有意差は認められなかった. 両方の pH を比べてみると, pH6 よりも pH7 の方がすべての処理濃度について, 産卵数および寿命で有意に短くなっていた. 今回調べた KGN 濃度では, エレガンスの産卵数が増えたり, 成長が早くなったり, 寿命が延びたりすることは観察できなかった. と同時に, それらと逆の悪い影響も認められなかった.

キーワード: ブレンドハーブ, KIPPO, 抗老化, 寿命, *Caenorhabditis elegans*.

1. はじめに

ここ数年で老化に関する研究数が飛躍的に増加し, 新しく老化に関するジャーナルが出版されはじめるなど, 老化が生命科学の中心的研究対象となってきた. けれど, テレンドの様相さえ帯びている(例えば 2003 年の Science 2 月 28 日号). このテレンドを演出した最大の立役者は, *Caenorhabditis elegans*(以下, エレガンス)において他にはない. 土壌自活性線虫であるエレガンスは, 遺伝学的解析が容易なこと(Brenner, 1974), いち早く全ゲノムが明らかになったこと(The *C. elegans* sequencing consortium, 1998), 分子を扱う技術も洗練されていることから, 現在もっとも注目されている実験動物となっている. 長寿遺伝子や寿命制御カスケードなど, エレガンスで発見された寿命に関わる遺伝子(Johnson, 1990; Ren et al., 1996; Schackwitz et al., 1996; Pierce et al., 2001)のオルソ

ログが, 酵母, ショウジョウバエ, マウス, そしてヒトにも存在することが証明された(Longo and Finch, 2003; Tatar et al., 2003). このように, エレガンスの研究が発端となってヒトにいたるまで生物界に広く保存されている寿命関連遺伝子の存在が明らかになり, エレガンスは寿命研究の強力なモデル生物としての地位を不動のものとしている.

ところで, スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$), 過酸化水素水(H_2O_2), ヒドロキシラジカル($OH^{\cdot}$)など様々な活性酸素種(Reactive oxygen species, 以下 ROS)が, エネルギー代謝の副産物として産出される. 生物の老化とともに生物にそなわっている ROS の除去能力が低下し, 結果として細胞に蓄積してゆくことが, 老化に関わる病気の原因ではないかという説がある(Beckman and Ames, 1998). そうであれば, ROS を除去する薬剤, もしくは生物に備わっている ROS 除

去能力を活性化する薬剤で生物を処理することにより, 生物の寿命がのびるのではないかと期待できる. 今回, 細胞の活性酸素を除去する能力を向上する効果があり, ヒトの老化に伴い発症する病気の症状を改善するという臨床例がある KIPPO (以下, KGN) をエレガンスに処方し, エレガンスの産卵数, 体長, そして寿命への影響について調べた.

2. 材料と方法

2. 1. 培地の作成

線虫 *Caenorhabditis elegans*, var. Bristol, strain N2 を本実験に用いた. エレガンスの培地である NGM は, pH が 6 のものと pH7 のものを作成した. pH6 については Brenner (1974) の方法に従い, pH7 については, pH6 のリン酸バッファーのかわりに, KOH で pH7

に調整したものを用いた.

KGN は自然の生薬をブレンドし, 乾燥してタブレット錠にしたもので (10 粒/袋), 1 日に 2 袋から 4 袋摂取する. 内容成分を Table 1 に示した. KGN を含む培地は次のように作成した. 蒸留水 25mL に KGN 一粒を溶解し, 5ml シヤーレに KGN 溶液を 50 μ l もしくは 100 μ l を直接加えたのち, NGM 培地を 5ml 分注した. KGN 溶液を 50 μ l 加えたときの NGM 培地内の濃度は, 体重 50kg のヒトが KGN を 1 日 2 袋 (20 粒) 摂取したものに相当し, これを KGN50 とする. また, KGN 溶液を 100 μ l 加えたときの NGM 培地内の濃度は, 体重 50kg のヒトが KGN を 1 日 4 袋 (40 粒) 摂取したものに相当し, これを KGN100 とする. これらの培地中央に大腸菌 *Escherichia coli* OP50 をスポットして, これを餌とした.

Table 1. KGN 内容成分

タイム	<i>Thymus vulgaris</i>	シソ科タチジャコウソウの開花期の全草
ローズマリー	<i>Rosmarinus officinalis</i>	シソ科マンネンロウの葉や枝
ウコン	<i>Curcuma longa</i>	ショウガ科ウコンの根茎
フェンネル	<i>Feniculum vulgare</i>	セリ科ウイキョウの果実
葡萄種子	Grape seed powder	ブドウ科ブドウの種子
蒲公英	<i>Taraxacum mongolicum</i> root	キク科タンポポの全草
エゾウコギ	<i>Acanthopanax senticosus</i>	ウコギ科ウコギの根皮

KIPPO Science Limited (<http://www.kippos.net/>)

2. 2. L1 幼虫から KGN 培地で培養

Sulston and Hodgkin (1988) の方法にしたがい, NGM プレートを用いて 20°C で培養したエレガンスから次亜塩素酸を使って卵を集めた. M9 バッファーで 4 回洗浄したのち, 大腸菌が撒かれていない NGM プレートに卵を移して, 20°C で数時間インキュベートした. L1 幼虫が孵化してくるので, ピッカーを用いて幼虫を Control 培地もしくは KGN 培地に移した. 産卵数の計測には 1 プレートあたり 1 頭ずつ, 体長および寿命の計測には 1 プレートあたりやく 10 頭ずつ培養した. KGN 培地を新鮮に保つため, エレガンスを移動させる前日に培地を作成し, 培養 2 日後 (48 時間後), つまり培地作成 3 日後 (72 時間後) にはエレガ

ンスを新しい培地に移しかえた. 培養 3 日目から 6 日目にかけての産卵時は, 産まれてくる F1 とを区別するために毎日新しい培地に移しかえた.

体長は, 培養開始 1 日目から 3 日目までの 3 日間, 培地からランダムにエレガンスを拾い, スライドグラス上の水滴内に移してからアルコールランプで軽くあぶり, 熱殺してから実体顕微鏡で測定した.

老化に伴いピッカーでの培地間の移動はエレガンスにとって大きな負担になると考えられるので, 培養 9 日目以降は KGN 溶液を 2 日毎に培地に添加していた. 毎日ピッカーで軽く触れ, 反応の有無でエレガンスの生死判定をおこなった.

2. 3. 産卵終了後から KGN 培地で培養

産卵が終了する6日目までは Control 培地で培養し、7日目から KGN 培地に移して培養をおこなった。9日目からはエレガンスを移動させずに、2日毎に KGN 溶液を培地に添加していった。このときの培地を、KGN50-2 および KGN100-2 とし、寿命について調べた。

2. 4. 統計分析

平均寿命の違いについては、分散分析 (ANOVA) をおこなうことでその有意性を検証した。

3. 結果と考察

ヒトの老化現象をはじめ、アルツハイマー病、パーキンソン病といった神経疾患に対して KGN が改善するという臨床結果が出ており、またマウスに対して活性酸素の除去、ヒト培養細胞について TNF- α の活性化による癌細胞の減少、といった報告がある (KIPPO Science Limited, 2003)。今回、KGN がエレガンスの老化現象にも作用し、寿命が延びるのではないかと予測を立て、KGN を添加した NGM 培地

で培養したときの平均寿命を計った。また、エレガンスの若齢時にも影響があるのかどうか、つまり産卵数、体長にも KGN が作用するかどうかについても調べた。

エレガンスの最適 pH である pH6 に調節した培地で産卵数を計測したところ、KGN の影響は認められなかった (Fig. 1)。KGN の有効 pH である pH7 の培地上での産卵数は、Control を含めて全体的に pH6 よりも低下した。また KGN100 では Control よりもやや低下するものの、KGN の影響はほとんど認められなかった (Fig. 1)。また、体長に関しては pH の影響も KGN の影響もともにみられなかった (Fig. 2)。

KGNを含むNGM培地で培養したときの寿命曲線を Fig. 3.に示した。KGNの有効 pH である pH7 の培地では、pH6 よりも全体の寿命は有意に短くなった (Table 2)。pH7の培地での特徴は、産卵後期に受精卵が親体内で孵化し、親が死んでしまう個体がたくさんみられた。また、同一 pH 内で KGN 処理をしたエレガンスのほうがコントロールより平均寿命が短くなっているが、有意性は認められなかった。

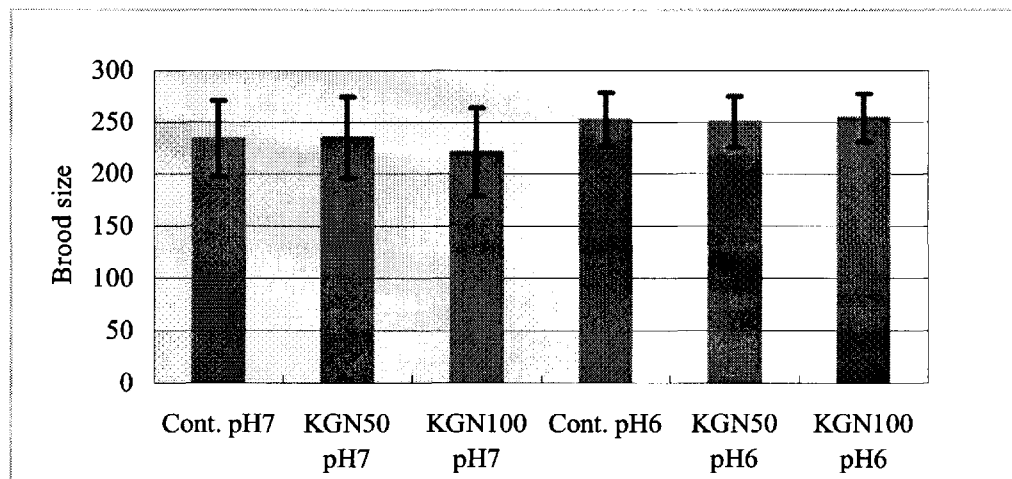


Fig.1. KGN が産卵数に与える影響。平均産卵数 $\pm$ S.D., 供試個体数はそれぞれ:pH7 のとき Cont. 233.9 $\pm$ 36.9 (n=9);KGN50, 235.1 $\pm$ 39.6 (n=9);KGN100, 221.1 $\pm$ 42.9 (n=9). pH6 のとき Cont. 252.4 $\pm$ 25.9 (n=8); KGN50, 249.8 $\pm$ 25.0 (n=8);KGN100, 254.0 $\pm$ 23.0 (n=8)。

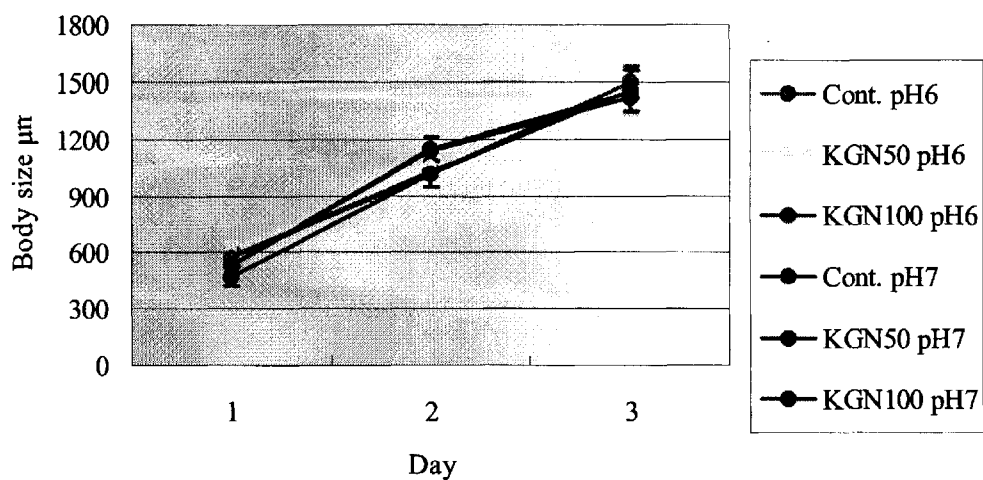


Fig. 2. KGNが体長に与える影響. 供試個体数は Cont.pH6 で, 1 日目 $n=20$, 2 日目 $n=20$, 3 日目 $n=12$. KGN50 pH6 で, 1 日目 $n=20$, 2 日目 $n=20$, 3 日目 $n=11$. KGN100 pH6 で, 1 日目 $n=20$, 2 日目 $n=20$, 3 日目 $n=15$. Cont. pH7 で, 1 日目 $n=20$, 2 日目 $n=20$, 3 日目 $n=12$. KGN50 pH7 で, 1 日目 $n=20$, 2 日目 $n=20$, 3 日目 $n=11$. KGN100 pH7 で, 1 日目 $n=20$, 2 日目 $n=19$, 3 日目 $n=14$.

Table 2. 平均寿命

	Control	KGN50	KGN100	KGN50-2	KGN100-2
pH=7	9.03 ± 3.27	7.51 ± 1.71	7.91 ± 2.30	8.56 ± 2.38	8.36 ± 2.03
pH=6	10.8 ± 4.44	9.54 ± 2.90	9.59 ± 3.19	10.17 ± 3.67	10.96 ± 3.98

単位は日で, 平均 $\pm$ S.D.を示す.

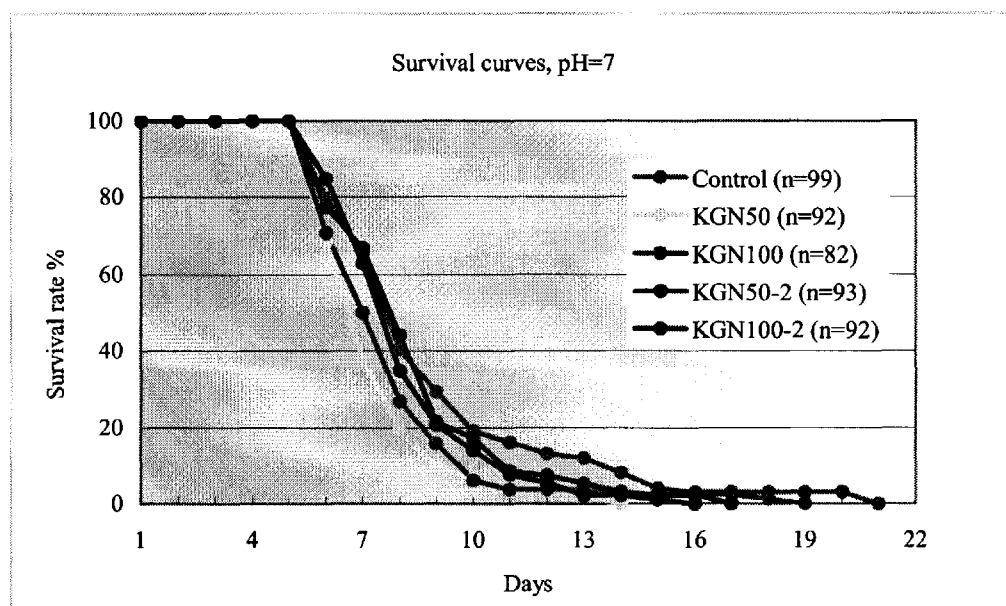


Fig. 3A. pH7 での寿命曲線.

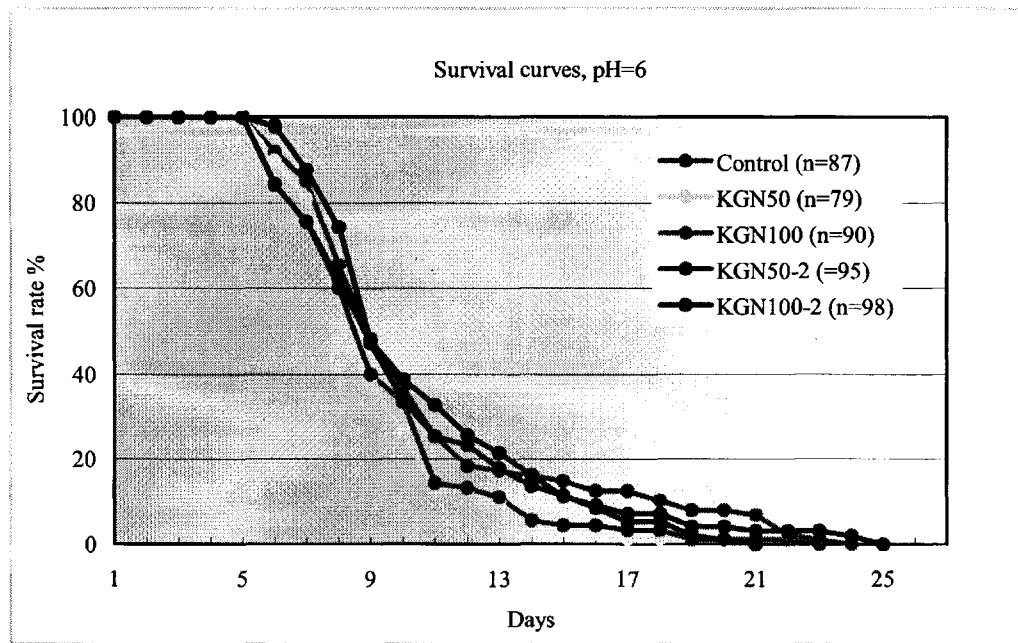


Fig. 3B. pH6 での寿命曲線.

今回の実験から、KGN の寿命への影響は確認できなかった。スーパーオキシディスムターゼ(SOD)類似化学物質 EUK-8 を含む液体培地でエレガンスを培養したとき、平均寿命が 44% 伸びるという報告があったが(Merov et al., 2000), 同様の実験をおこなったところ、濃度に比例して寿命が短くなったという報告もあった(Keaney and Gems, 2003; Gems and Vanfleteren, 私信). 本実験では個体培地である NGM に KGN を溶解して、実験をおこなった. このような方法で、化合物一般の安全性を評価できる統合的な毒性試験法が確立しており(三輪と古沢, 1982; 三輪ら, 1983; Miwa and Furusawa, 1984), 発癌プロモーターの検出および作用機序の解明にも有効であることが証明されている(Tabuse, et al., 1989; Tabuse, et al., 1995; Sano, et al., 1995). さらに、極微量濃度の物質がエレガンスの寿命に与える影響を測定するのにも有効であることがわかっている(Hasegawa et al., 2004). エレガンスは大腸菌を餌に増殖するので、培地に含まれる KGN は培地中の水分溶液として、また餌である大腸菌をととして摂取していると考えられる. 後者の場合、大腸菌の代謝により KGN 本来の効力がなくなっている、または弱まっている可能性もあ

る. 大腸菌の代謝を抑え、大腸菌による KGN の変化を最小にすることが必要となってくる. したがって、代謝をしていない大腸菌と液体培地(S medium)を用いた KGN 処理線虫と無処理線虫との平均寿命の比較をする予定である. また、老化に伴う生理活性(ATP 活性もしくは SOD 活性)の変化についても測定し、KGN による影響を捉えることを計画中である.

引用文献

- Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging mature. *Physiol. Rev.* 78, 547-581.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Hasegawa, K., Miwa, S., Tsutsumiuchi, K., Taniguchi, H. and Miwa, J. (2004) Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Letters* 152 183-189.

- Johnson, T. E. (1990) Increased life-span of *age-1* mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower gompertz rate of aging. *Science* 249, 908-912.
- Keaney, M. and Gems, D. (2003) No increase in lifespan in *Caenorhabditis elegans* upon treatment with the superoxide dismutase mimetic euk-8. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 277-282.
- KIPPO Science Limited (2005)
(<http://www.kippos.net/>).
- Longo, V. D. and Finch, C. E. (2003) Evolutionary Medicine: From dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 299, 1342-1346.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallance, D.C., Malfory, B., Doctrow, S. R. and Lithgow, G. J. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289, 1567-1569.
- 三輪錠司, 古沢満 (1982) 線虫を用いる化学物質の毒性試験法. 日本国特許庁, 特許公報, 昭57-029155 号.
- 三輪錠司, 湯川宏, 田伏洋 (1983) 線虫を用いた毒性試験法. トキシコロジーフォーラム 6, 659-670.
- Miwa, J. and Furusawa, M. (1984) Method for testing toxicity of chemical substance by using nematode. United States Patent and Trademark Office, U. S. PAT. 4, 444, 891.
- Pierce, S. B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S. A., Buchman, A. R., Ferguson, K. C., Heller, J., Platt, D. M. and Pasquinnelli, A. A. (2001) Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev.* 15, 672-686.
- Ren, P. F., Lim, C. S., Johnsen, R., Albert, P. S., Pilgrim, D., Riddle, D. L. (1996) Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF- β homolog. *Science* 274, 1389-1392.
- Sano, T., Tabuse, Y., Nishiwaki, K. and Miwa, J. (1995) The *tpa-1* gene of *Caenorhabditis elegans* encodes two proteins similar to Ca^{2+} -independent protein kinase Cs: Evidence by complete genomic and complementary DNA sequence of the *tpa-1* gene. *J. Mol. Biol.* 251, 477-485.
- Schackwitz, W. S., Inoue, T., Thomas, J. H. (1996) Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17, 719-728.
- Sulston, J. and Hodgkin, J. (1988) Methods. In: Wood, W. B., et al. (Eds.) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 587-601.
- Tabuse, Y., Nishiwaki, K. and Miwa, J. (1989) Mutations in a protein kinase C homolog confer phorbol ester resistance on *Caenorhabditis elegans*. *Science* 243, 1713-1716.
- Tabuse, Y., Sano, T., Nishiwaki, K. and Miwa, J. (1995) Molecular evidence for the direct involvement of protein kinase C in developmental and behavioural susceptibility to tumour-promoting phorbol esters in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 312, 69-74.

Tatar, M., Bartke, A. and Antebi, A. (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346-1351.

The *C. elegans* sequencing consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.

Title: Effects of KGN, a blended herbal tablet, on the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Authors: Koichi Hasegawa^{1,2)}, Satsuki Miwa¹⁾, and Johji Miwa^{1,3)}

Addresses: ¹⁾ Institute for Biological function, Chubu University.

²⁾ Laboratory of Environmental Mycoscience, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.

³⁾ Department of Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

Keywords: blended herb, KIPPO, anti-ageing, lifespan, *Caenorhabditis elegans*

Summary

Effects of KGN, a blended herbal tablet, on the nematode *Caenorhabditis elegans*

Koichi Hasegawa^{1,2)}, Satsuki Miwa¹⁾, and Johji Miwa^{1,3)}

¹⁾ Institute for Biological function, Chubu University.

²⁾ Laboratory of Environmental Mycoscience, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.

³⁾ Department of Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

KIPPO (KGN) is a blended herbal tablet made of 100% natural substances. Studies in laboratory mice have shown that KGN is a functional food that acts as an anti-oxidant and improves ATP activity. When taken over time, it reportedly ameliorates the symptoms of many chronic human diseases associated with ageing, such as dementia, rheumatism, diabetes, and cancer (KIPPO Science Limited). In this report we used the model organism *Caenorhabditis elegans* as a whole animal system to examine the effects of KGN on the animal's growth, brood size (as a measure of fecundity), and lifespan. No deleterious consequences were observed in animals treated from juvenile and late adult stages in the presence of two KGN concentrations (1x and 2x the recommended dose) at pH 6, which is the optimal pH for *C. elegans*, and at pH 7, which is optimal for KGN's activity in humans. When grown at pH 7, the animals' brood size and lifespan were slightly decreased compared with those grown at pH 6, for both KGN concentrations. We conclude that KGN at these concentrations exerted no observable effects on the animals' brood size, growth, or life span.

Keywords: blended herb, KIPPO, anti-ageing, lifespan, *Caenorhabditis elegans*