

The 4th Symposium on Pharmaceutical Food Science

PO17

「Chemical and Biological Evaluation of Fermented Taheebo」

発酵タヒボの化学的および生物学的評価

Kazunori Ueda, Chie Yamashima and Akira Iida (Faculty of Agriculture, Kinki University), Harukuni Tokuda (Graduate School of Medical Science, Kanazawa University), Masafumi Kaneko (Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare)

Brazilian medicinal plant *Tabebuia avellanedae* known in folk medicine as Taheebo is used in North and South America for many years as an anticancer, antifungal, antibacterial and anti-inflammatory drug. Recently, we have prepared fermented Taheebo by treating Taheebo with several microorganisms including *Lactobacillus* and have evaluated its biological activity including cancer chemopreventive, antiproliferative, and anti-inflammatory activities.

Keywords: *Tabebuia avellanedae*, fermentation, anticancer effect, cancer chemoprevention, anti-inflammatory effect

ブラジル原産薬用植物タヒボ(*Tabebuia avellanedae*)は、北米ならびに南米において、長年にわたり、がんや炎症あるいは真菌や細菌に対して抑制効果のある民間薬として利用されてきた。一方、われわれは、本植物のがん予防効果¹⁾, ²⁾やがん細胞に対する細胞増殖抑制活性³⁾, ⁴⁾ならびに抗炎症効果について長年検証を加え、本植物の食品としての機能と有効性を明らかにしてきた。われわれは、それらをさらに向上させ、本植物に由来する食品の付加価値を高めるために発酵に着目した。発酵は、食品自体が本来持つ有効性や機能性を高めることができる、あるいは新たな機能を付加することができる有効な手段である。したがって、本植物についても発酵により何らかの有効性の変化が期待できると考えた。今回、本植物樹皮を乳酸菌などで処理した、いわゆる発酵タヒボを作製し、その化学的、生物学的評価を行った。

【方法】

・発酵

タヒボジャパンより供与されたタヒボ茶に繊維分解菌を加え、3日間60～70℃に加温した。次に、乳酸菌、酵母菌、麹菌で2週間、5℃の低温発酵を行い、発酵タヒボを得た。

・マウス皮膚二段階発がん

本実験には、ICRマウスを用いた。マウス皮膚に発がん物質DMBA (100 µg) を塗布し、一週間後、発がんプロモーターTPA (1 µg) を週2回、20週塗布した(ポジティブコントロール)。一方、TPAの塗布前に抗発がんプロモーターとしての発酵タヒボ (50 µg)あるいはタヒボ (50 µg) を塗布することにより、それらのがん予防効果を調べた。

・抗炎症活性

本活性試験は、動物と細胞を用いる2種類の実験系で行った。前者は、化学炎症剤としてTPAを用いた。マウス耳に5 µgのTPAを塗布する30分前か、あるいは塗布した3分後に100 µgの発酵タヒボあるいはタヒボを塗布して生じた発赤の面積からそれらの抗炎症効果を評価した。一方、後者にはヒト由来皮膚細胞CHP-4を用いた。細胞培養液を加温式スターラー上で80℃、1分間加温し、その前後に1mgと0.1mgの発酵タヒボあるいはタヒボを培養液に加えた。細胞障害により浮遊する細胞数を計測し、それらの抗炎症効果を評価した。

a food. Thus, we focused attention on fermentation to improve its potency and added value, which can refine effectiveness and functionality of foods or effective way to add new functions. Accordingly, we expected fermentation to improve the potency of this plant. In this study, we have prepared fermented Taheebo and have conducted chemical and biological assessment of it.

<Methods>

Fermentation

A powdered inner bark of *T. avellanedae*, which is called Taheebo tea and provided by TAHEEBO Japan Co., Ltd., was treated with a fiber-degrading enzyme at 60-70℃ for 3 days and then, fermented by *Lactobacillus*, *Saccharomyces* and *Aspergillus* at 5℃ for 2 weeks to afford fermented Taheebo tea.

Two-stage mouse skin carcinogenesis

ICR mice were used for this study. Carcinogenic DMBA (100 µg) was applied to mouse skin. After one week, the same skin portion was painted with tumor promoter TPA (1 µg) twice a week and this manipulation was continued for 20 weeks (positive control). On the other hand, fermented Taheebo (50 µg) or Taheebo (50 µg) as the antitumor promoter was applied to the mouse skin treated with DMBA before the application of TPA.

Anti-inflammatory activity

In vivo and in vitro anti-inflammatory activity was examined. The former test was conducted by applying TPA to the mouse ear. Fermented Taheebo or Taheebo (100 µg each) was applied 30 min before or 3 min after TPA (5 µg). Anti-inflammatory effects were estimated by comparing reddened areas on the ears. On the other hand, CHP-4, skin cell of human origin, was used for the latter experiment. Fermented Taheebo or Taheebo (1 mg or 0.1 mg each) was added to culture solutions before or after heating them at 80 °C for 1 min. Anti-inflammatory effects were evaluated by counting floating cells resulting from cell damage.

■English translation

The Brazilian medicinal plant, Taheebo (*Tabebuia avellanedae*), has been used in folk medicine as anticancer, antiinflammatory, antifungal, antibacterial drug in South America from Brazil to north Argentina. We have investigated its antiproliferative effects against tumor cells and anti-inflammatory effect and have demonstrated its functions and effectiveness as

【結果と考察】

・発酵

タヒボおよび発酵タヒボをそれぞれMeOHで抽出し、逆相HPLCで分析すると、極性画分の溶出パターンに顕著な違いが認められた。一方、タヒボの抗がん活性成分が含まれる非極性画分には大きな差は観察されなかった。

・マウス皮膚二段階発がん

ポジティブコントロールでは、10週目にすべてのマウスにパピローマが発生した。一方、発酵タヒボとタヒボで処理したグループでは、すべてのマウスにパピローマが発生するのにそれぞれ、15週と14週を必要とした。また、マウス一匹当たりに発生したパピローマ数を、発酵タヒボとタヒボで処理したグループで比較すると、発酵タヒボで処理したグループの方が有意な差でパピローマ数が少ないことが分かった。これらの結果は、がん予防効果に関して、発酵タヒボはタヒボよりも優れていることを示している。がん予防効果に影響を与える成分が含まれる画分に大きな差がないことはHPLC分析により判明している。したがって、発酵により増加した成分あるいは新たに生成した成分が、がん予防効果を高める、すなわち抗発がんプロモーターとして機能していること、あるいは、タヒボに含まれる既存の抗発がんプロモーターの活性を増強させていることが示唆された。

・抗炎症活性

マウスを用いた実験において、発酵タヒボとタヒボの塗布をTPA塗布前に行った場合、いずれにも抗炎症効果は認められなかった。一方、発酵タヒボとタヒボの塗布をTPA塗布後に行った場合、発酵タヒボには抗炎症活性が認められたが、タヒボには認められなかった。

CHP-4細胞を用いた実験において、発酵タヒボとタヒボの添加を加熱前に行った場合、発酵タヒボにはやや抗炎症効果は認められたが、タヒボには抗炎症効果は認められなかった。一方、発酵タヒボとタヒボの添加を加熱後に行った場合、いずれにも抗炎症効果は認められたが、その効果は発酵タヒボの方が強かった。タヒボの真の抗炎症活性成分は、いまだ特定されていないが、発酵により増加した成分あるいは新たに生成した成分に、がん予防効果においてみられたように、抗炎症効果を高める、あるいはタヒボに含まれる既存の抗炎症物質の活性を増強させていることが示唆された。

【結論】

発酵によりタヒボに本来含まれる有効成分の含量が増加する、あるいは新しい有効成分が生成する可能性が示唆された。また、タヒボの機能性向上に発酵が有効な手段であることも示された。

参考文献

- 1) Ueda, S., Tokuda H. *Planta Med.*, 56, 669 (1990)
- 2) Ueda, S., Umemura, T., Dohguchi, K., Matsuzaki, T., Tokuda, H., Nishino, H., and Iwashima A. *Phytochemistry*, 36, 323 (1994)
- 3) Yamashita, M., Kaneko, M., Iida, A., Tokuda, H., and Nishimura, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 6417 (2007)
- 4) Yamashita, M., Kaneko, M., Tokuda, H., Nishimura, K., Kumeda Y., and Iida, A. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 6286 (2009)

■English translation

<Results and discussion>

Fermentation

Taheebo and fermented Taheebo were extracted with MeOH and the MeOH extracts obtained were analyzed by the reverse-phase HPLC. Significant differences were recognized in the elution profiles of polar constituents. On the other hand, the elution profiles of non-polar constituents were little different from each other.

Two-stage mouse skin carcinogenesis

In positive control, all mice bore papillomas in 10 weeks. On the other hand, the mice treated with fermented Taheebo or Taheebo bore papillomas in 15 and 14 weeks, respectively. Moreover, the number of papillomas per mouse in the group treated with fermented Taheebo was smaller than those in the group treated with Taheebo. These results show that cancer chemopreventive activity of fermented Taheebo is superior to that of Taheebo. HPLC analyses have already shown that there were no significant differences in the elution profiles of non-polar constituents associated with cancer chemopreventive activity. Therefore, this finding suggests that increased or newly metabolized constituents by fermentation help cancer chemopreventive activity or activate the known antitumor promoters in Taheebo.

Anti-inflammatory activity

In in vivo experiments, no anti-inflammatory activity was observed when fermented Taheebo or Taheebo was applied to mouse ears before TPA. On the other hand, moderate anti-inflammatory activity was observed only in the group treated with fermented Taheebo when they were applied to mouse ears after TPA.

In the experiments using CHP-4 cells, weak anti-inflammatory activity was observed only when fermented Taheebo was added to culture solutions before heating. On the other hand, both fermented Taheebo and Taheebo showed anti-inflammatory activity when they were added after heating. However, the activity of fermented Taheebo was more potent than that of Taheebo. Anti-inflammatory constituents contained in Taheebo are unknown, but it was suggested that increased or newly metabolized constituents by fermentation help anti-inflammatory activity or activate anti-inflammatory constituents in Taheebo as was described in cancer chemopreventive activity.

<Conclusions>

This study suggested that fermentation could increase active principles originally contained in Taheebo or produce new active constituents. In addition, it was shown to be an effective strategy to improve the functionality of Taheebo.

<References>

- 1) Ueda, S., Tokuda H. *Planta Med.*, 56, 669 (1990)
- 2) Ueda, S., Umemura, T., Dohguchi, K., Matsuzaki, T., Tokuda, H., Nishino, H., and Iwashima A. *Phytochemistry*, 36, 323 (1994)
- 3) Yamashita, M., Kaneko, M., Iida, A., Tokuda H., and Nishimura, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 6417(2007)
- 4) Yamashita, M., Kaneko, M., Tokuda, H., Nishimura K., Kumeda Y., and Iida, A. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 6286 (2009)