

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580135

研究課題名（和文） 免疫（感染防御）システムに有利なタンパク質摂取法の解明

研究課題名（英文） Effects of dietary protein on immunological activity and host resistance to fungal infection in mice

研究代表者

大荒田 素子 (OARADA MOTOKO)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号：40211784

研究成果の概要（和文）：病原真菌感染症をモデルに、生体の免疫システム（感染防御能）に有利なタンパク質摂取法を明らかにすることを目的とした。低タンパク質食を摂取したマウスでは、標準レベルのタンパク質食を摂取したマウスと比べて、感染防御能が向上した。一方、高タンパク質食を摂取したマウスでは、感染防御能が低下した。高タンパク質食の摂取により感染に伴う炎症反応の誘導が増強され、肝細胞傷害も増大した。生体の免疫システムには、低タンパク質食の摂取（ただし栄養不良ではない）が有効であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： In an effort to establish the optimum diet for host resistance, we investigated the effect of different dietary protein levels on host resistance to pathogenic fungi. Mice refed low protein diet showed higher antifungal activity in the spleen and liver compared with mice on the normal protein diet. In contrast, mice refed high protein diet showed reduced antifungal activity in these organs. The present results imply that protein restriction without malnutrition could be beneficial to host resistance to pathogenic fungi, but high protein intake impairs host resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：栄養化学

1. 研究開始当初の背景

従来、体重増加法（成長率）による評価から、質の高い（アミノ酸バランスの良い）タンパク質を十分な量、摂取することが生体にとって有利であると考えられてきた。確かに

アフリカや東南アジアの低開発国に見られるクワシオルコルのような著しいタンパク質欠乏症は、免疫システムを含むさまざまな生体機能を低下させ、感染症への罹患率を増加させる。しかし、従来の体重増加法を評価基準として決められたタンパク質の摂取法

(いわゆる標準レベルと言われている摂取量)が、免疫システムにとって有利なもの(最良なもの)であるかは、研究の余地がある。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の摂取量と質(アミノ酸組成)が免疫(感染防御)システムにおよぼす影響について明らかにすることで、免疫システムにとって有利なタンパク質摂取法を確立する。そのため病原真菌感染症をモデルに、感染防御システムにおよぼす食餌タンパク質の摂取量とアミノ酸組成の影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 病原真菌(*Paracoccidioides Brasiliensis*)感染症をモデルに、タンパク質含量の異なる餌、およびアミノ酸組成の異なるタンパク質を含む餌を摂取したマウスの感染防御システム(抗菌活性、免疫応答、炎症反応)について比較検討した。

① 餌の調製: カゼインを 0, 1.5, 5, 20 および 54 % (w/w) 含む餌を調製した。総カロリー量を炭水化物(α -コーンスターチ)で統一した。また、アミノ酸組成の異なるタンパク質食として、カゼイン+ DL-メチオニン、大豆タンパクもしくは小麦グルテンを 5, 20 および 40 % (w/w) 含む実験食を調製した。

② 動物実験・感染実験: Balb/c 系マウス(6週令)に1週間、標準食を自由摂取させた後、2日間絶食させた。その後、*P. brasiliensis*を1回静脈接種し、直ちに実験食で復食させた。接種7日後まで経時的に*P. brasiliensis*菌の標的臓器である肝臓、脾臓および血液を採取し、以下の分析に供した。

③ 抗菌活性の測定: 標的臓器(脾および肝臓)に生存する接種菌の数を平板寒天培地上への逆培養法によりカウントした。

④ サイトカイン産生・分泌測定: 標的臓器および血中の炎症性、Th1系およびTh2系サイトカインの濃度を測定した。

⑤ 炎症・免疫関連物質の遺伝子発現解析:

標的臓器から mRNA を分離・精製し、定量的逆転写 PCR 法により遺伝子発現を調べた。

⑥ 宿主の栄養状態の確認: 総タンパク質、アルブミン、尿素窒素、ビリルビン、トリグリセリドおよびグルコースの血中濃度を測定した。

(2) 食餌性タンパク質が感染防御能に及ぼす影響のメカニズムを明らかにする目的で、感染実験に用いた *P. brasiliensis* 菌の標的臓器であり、かつ免疫機能を持つ肝臓の実質細胞に対するタンパク質摂取量およびアミノ酸組成の影響について検討した。

① 餌の調製: カゼインを 3, 15, 35, 40, 45 および 50 % (w/w) 含む餌を調製した。総カロリー量を炭水化物(α -コーンスターチ)で統一した。

② 動物実験: Balb/c 系マウス(6週令)に1週間、標準食を自由摂取させた後、2日間絶食させた。その後、実験食で復食させた。復食17時間後まで経時的に肝臓および血液を採取し、以下の分析に供した。

③ ストレス応答・DNA修復関連および最初期遺伝子の発現解析: 肝臓から mRNA を分離・精製し、定量的逆転写 PCR 法により遺伝子の発現を調べた。

④ 肝障害および栄養状態の確認: 総タンパク質、アルブミン、尿素窒素、alanine aminotransferase (ALT) および aspartate aminotransferase (AST) 活性、中性脂肪およびグルコースの血中濃度を測定した。

⑤ 酸化環境(酸化ストレス)の確認: 肝臓および血中の過酸化脂質と抗酸化物質濃度を測定した。また肝臓の活性酸素関連酵素の活性を測定した。

⑥ サイトカインおよびストレスホルモンの産生・分泌測定: 肝臓の炎症性サイトカインおよび血中ステロイドホルモン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 食餌性タンパク質が病原真菌

P. brasiliensis 感染抵抗能に及ぼす影響

脾臓および肝臓の抗菌活性が、1.5% カゼイン含有食で復食したマウスで、20% カゼイン含有食で復食したマウスと比べて有意に増加した。(表 1, 2) 0% カゼイン含有食で復食したマウスでは、脾臓の抗菌活性は1.5% カゼイン食を復食したマウスより低下したが、20% カゼイン食を復食したマウスと比べて増加した。

表 1 *P. brasiliensis* を感染させた後、0%, 1.5% および 20% カゼイン含有食を復食したマウスの脾臓における生菌数の経時変化

カゼイン含有率	コロニー形成単位				
	0*	1	3	5	7
20%	5088	3964	6602 ^a	3468 ^a	1413 ^a
1.5%	4938	3415	3465 ^b	1461 ^b	565 ^b
0%	5669	3350	5084 ^{a,b}	2048 ^b	906 ^{a,b}

*感染後の日数. Day 0, 菌接種3時間後.

表 2 *P. brasiliensis* を感染させた後、0%, 1.5% および 20% カゼイン含有食を復食したマウスの肝臓における生菌数の経時変化

カゼイン含有率	コロニー形成単位				
	0*	1	3	5	7
20%	34234 ^b	23023 ^b	65057	33251 ^a	11504 ^a
1.5%	38133 ^{a,b}	25567 ^b	50855	15147 ^c	5646 ^b
0%	45890 ^a	31832 ^a	70155	22249 ^b	8995 ^{a,b}

*感染後の日数. Day 0, 菌接種3時間後.

感染中期から後期にかけて、脾臓および肝臓で、インターロイキン-6 (IL-6) およびインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生量が増加し、抗菌ペプチド (ミエロペルオキシダーゼ、カ

テプシン-G、エラスターゼ-2) や炎症メディエーター (IL-18, CXCL10, NF- κ B, iNOS, GM-CSF) の mRNA 発現量が増大した。これらサイトカインや炎症性物質の発現誘導は、20% カゼイン食を復食したマウスと比べて、1.5% や 0% カゼイン食を復食したマウスで軽減された。今回の結果は、低タンパク質食の摂取 (栄養不良ではない) が、病原真菌 *P. brasiliensis* に対する感染抵抗能を増大させることを示している。

一方、54% カゼイン (高タンパク質) 食を復食したマウスでは、5% カゼイン (低タンパク質) もしくは20% カゼイン (標準タンパク質) 食を復食したマウスとくらべて、脾臓および肝臓の抗菌活性が低下した。高タンパク質食による復食では、低タンパク質食や標準タンパク質食による復食と比べて、感染中期から後期にかけて感染に伴う抗菌ペプチド (ミエロペルオキシダーゼ、カテプシンG、エラスターゼ2) の発現誘導が増大した。さらに感染に伴うIFN- γ 、iNOS および過酸化脂質の肝臓での発現誘導が、高タンパク質食を復食したマウスでは、低タンパク質食や標準タンパク質食を復食したマウスと比べて増加していた。

炎症反応は感染防御システムにおいて重要な役割を担っているが、過剰な炎症反応は病原体のみならず宿主の細胞にも障害をおよぼすことが知られている。多くの研究から、感染症による細胞・組織障害の原因が、病原菌の作用ではなく、過剰な炎症反応にあることが証明されている。感染症にともなう過剰な (必要のない) 炎症反応を軽減することが生体にとって重要である。今回、感染中期から後期にかけて、炎症性物質の誘導が低タンパク質食の摂取により軽減され、逆に高タンパク質食の摂取により増大した。食餌性タンパク質が、感染に伴う炎症誘導の変調を介して、標的臓器の細胞傷害の程度、さらには病原菌の駆除機能に影響を及ぼしていることが考えられる。

高タンパク質食による宿主の病原真菌感染防御能の低下が、タンパク質の種類 (アミノ酸組成) の影響を受ける可能性について検討した。*P. brasiliensis* 菌で感染後、カゼイン+DL-メチオニン、大豆タンパク質もしくは小麦グルテンを40% 含む実験食で復食した場合、当菌に対する抗菌活性の有意な差は認められなかった。この結果から、高タンパク

質食による感染抵抗能の低下は、タンパク質のアミノ酸組成の影響を受けないことが明らかとなった。

(2) 食餌性タンパク質が、肝細胞に及ぼす影響

肝細胞に対する食餌性タンパク質の影響をより詳細に調べることで、食餌性タンパク質が病原菌の感染防御能を変動させる機構を探った。

実験動物(マウス)を48時間絶食後、50%カゼイン含有食で復食させると、復食2時間後に血中ALTおよびAST活性の急激な増加が生じた。(表3)この増加は復食11時間後まで続いた。一方、35%カゼイン含有食で復食したマウスでは、復食2時間後に一時的に中程度のALTとAST活性の増加が見られたが、3%および15%カゼイン含有食で復食したマウスでは、ALTおよびAST活性の増加はごくわずかであった。さらに35、40、45および50%カゼイン食で復食したマウスでは、血中ALTおよびAST活性の増加の割合は、カゼイン含有量に比例していた。最初期遺伝子は、細胞傷害により発現誘導され、組織の修復や細胞死に関与している。50%カゼイン含有食で復食したマウスでは、最初期遺伝子*c-fos*および*nur77*の発現誘導が見られた。これらの結果は、タンパク質の過剰摂取が急性の肝細胞傷害を引き起こすことを示している。

熱ショックタンパク質は、様々な傷害やストレスに伴い発現誘導され、細胞を守る機構の中で重要な役割を担っていることが知られている。熱ショックタンパク質のひとつheat shock protein 72 (Hsp72)の発現が、低タンパク質や標準タンパク質食の復食により肝臓で十分量誘導されたのに対して、高タンパク質食の復食では、大幅に軽減された。熱ショックタンパク質の発現誘導の低下が、高タンパク質の復食による肝細胞傷害の一因であると示唆された。また、DNA修復関連遺伝子の発現が、35%カゼイン食の復食で増加したのに対し、50%カゼイン食の復食では増大しなかった。熱ショックタンパク質によるストレス対応やDNA修復は、真菌や細菌、ウイルスなどの病原体から肝実質細胞が受けるダメージを軽減し、細胞を保護し、かつ病原体を駆除する上で、大変重要な働きをするこ

とが考えられる。高タンパク質食の復食で、これらの作用が低下したことは、高タンパク質食による病原真菌感染抵抗能の低下の一因となることが、推測された。

表3 絶食後、3%、15%、35%および50%カゼイン含有食で復食したマウスの各因子の変動

指標	48時間 実験食				
	絶食	3%* diet	15% diet	35% diet	50% diet
(1) Hepatocellular injury :					
serum ALT, AST	—*	—*	—*	—*	↑
(2) Gene expression (liver) :					
heat shock protein <i>Hsp72</i>	—*	↑	↑	↑	—*
immediate early gene <i>c-fos, nur77</i>	—*	—*	—*	—*	↑
DNA damage <i>Gadd45g</i>	—*	—*	—*	↑	↑
genotoxic stress <i>Btg2</i>	—*	—*	—*	—*	↑
DNA repair <i>Ung</i>	—*	—*	—*	↑	—*
inflammatory mediator <i>Crp</i>	—*	↓	↓	↓	↓
(3) Antioxidant enzyme activity (liver) :					
GST, CAT, SOD	—*	↓	↓	↓	↓
(4) Lipid peroxidation (liver) :					
TBARS	↑	re↑	re↑	re↑	re↑
(5) Proinflammatory cytokine (liver) :					
TNF-α, IL-1β	—*	↓	↓	↓	↓
IL-6	↑	re↑	re↑	re↑	re↑
(6) Steroid hormone :					
serum corticosterone	↑	re↑	re↑	re↑	re↑
(7) Hypophosphatemia :					
serum inorganic phosphorus	↓	re↑	re↑	re↑	re↑

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; *Btg2*, B-cell translocation gene 2, anti-proliferative; CAT, catalase; *c-fos*, FBJ osteosarcoma oncogene; *Crp*, C-reactive

protein; *Gadd45g*, growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma; GST, glutathione S-transferase; *Hsp72*, heat shock protein 72; *nur77*, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; *Ung*, uracil-DNA glycosylase.

* 有意な変化なし、もしくはごくわずかな変化が認められた。† re; 標準レベルにもどった。

本研究では、現代人にとって有利なタンパク質摂取法を従来の判定基準（成長率）ではなく、免疫（感染防御）システムに対する影響から検討した。日本では、タンパク質やアミノ酸関連のサプリメントをだれもが容易に購入できる。アミノ酸の生体内でののはたらきが明らかにされてきたことに伴い、機能改善や栄養補給の目的で、これらのサプリメントを利用する人も多い。また食の欧米化が進み、肉や乳製品の摂取量が増えている。従来の研究から、タンパク質を過剰摂取しても、成長率は悪影響を受けないことが明らかにされている。しかし今回の研究では、低タンパク質食が感染防御能を増強し、逆に高タンパク質食が防御能を抑制する結果となった。タンパク質を過剰摂取した場合、感染にともなう炎症反応が強まり、宿主の組織障害が生じ、その結果、感染防御能が低下することが考察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Oarada M, Tsuzuki T, Nikawa T, et al. Refeeding with a high-protein diet after a 48h fast causes acute hepatocellular injury in mice. *Brit J Nutr.* 2012;107:1435-1444. PMID:21902856 査読有

② Oarada M, Igarashi M, Tsuzuki T, Kamei K, et al. Effects of a high-protein diet on host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74:620-626. PMID:20208341 査読有

③ Oarada M, Igarashi M, Tsuzuki T, et al. Effect of dietary oil on host resistance

to fungal infection in psychologically stressed mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73:1994-1998. PMID:19734677 査読有
④ Oarada M, Kamei K, Gono T, et al. Beneficial effects of a low-protein diet on host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. *Nutrition* 2009;25:956-63. PMID:19403266 査読有

[図書] (計 1 件)

① 大荒田素子 (分担) 食品の機能化学, アイ・ケイ・コーポレーション 2010. pp.2-6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大荒田 素子 (OARADA MOTOKO)
千葉大学・真菌医学研究センター・助教
研究者番号: 40211784

(2) 研究分担者

亀井 克彦 (KAMEI KATSUHIKO)
千葉大学・真菌医学研究センター・教授
研究者番号: 10214545