

## 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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580306

研究課題名（和文） ビール酵母とその牛乳特異抗体によるアレルギー軽減作用の解明

研究課題名（英文） Studies on anti-allergic properties of a mixture of *Saccaromyces pastorianus* and its specific cow's milk antibody

研究代表者

大谷 元 (OTANI HAJIME)

信州大学・農学研究科・教授

研究者番号：30109201

研究成果の概要（和文）：

ビール酵母とそれを免疫したホルスタイン牛の初乳から調製した牛乳抗体の混合物は、ビール酵母単独や牛乳抗体単独では観察されない I 型アレルギー症状を有意に軽減することをマウスで確認した。混合物は高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数を有意に減少させ、脱顆粒を抑えることがアレルギー軽減に寄与していることを明らかにした。また、混合物のマウスへの経口投与試験により混合物は安全な抗アレルギー食材であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The author prepared an IgG-rich fraction specific to *Saccaromyces (S.) pastorianus* (milk antibody) from colostrum produced by a *S. pastorianus*-immunized cow. The allergic symptoms indicated as nose rubbing events of mice NC/Nga mice and ear thickness of BALB/c mice given a diet containing a mixture of *S. pastorianus* and milk antibody (mixture-added diet) were significantly lower than in those given the *S. pastorianus* and milk antibody-free diet (control diet). The number of FcεRIα<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> cells and mRNA expression of STIM1 were significantly lower in spleens of NC/Nga mice given the mixture-added diet than in those given the control diet. The mRNA expression of all subunit chains of IgE receptor, i.e. FcεRIα, FcεRIαβ and FcεRIγ, and proteins such as STIM1, BTK and ITK relating to degranulation was significantly reduced in C3H/HeN mouse spleen cell cultures with a mixture of *S. pastorianus* and milk antibody than in those without the *S. pastorianus* and/or milk antibody. On the other hand, only minimal acute toxicity was observed in ICR mice given 2,000 mg of *S. pastorianus* and/or milk antibody/g body weight. These results suggest that the mixture of *S. pastorianus* and milk antibody represents a safety anti-allergic food material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：牛乳抗体、アレルギー軽減、機能性食品素材

1. 研究開始当初の背景

Fab 領域で抗原と特異的に結合し、Fc 領域の

エフェクター機能により補体や食細胞を活性化させて抗原を効率的に無毒化するとい

うことが教科書に書かれている IgG の生物学的機能である。ところが、ヒトの腸内細菌を免疫したウシの乳汁から調製した IgG を経口摂取したヒトにおいて、自己免疫疾患が軽減したという臨床的報告がなされている。このような軽減効果は IgG に従来知られている機能では説明のできないところである。このことから申請者は、乳汁 IgG には従来知られている抗原結合機能とエフェクター機能以外に能動的な免疫調節機能が存在するという仮説を立て、平成 16 年・17 年度科学研究費補助金萌芽研究や平成 19 年～21 年度科学研究費補助金基盤研究 (C) の援助を受けて実験を進め、遊離の牛乳 IgG はマウスパイエル板や脾臓の免疫細胞に FcγRI を介して結合することにより免疫グロブリンの産生を促し、大腸菌とその牛乳 IgG の複合体は免疫細胞に FcγRIIb を介して結合することにより免疫グロブリンの産生を抑制することを示した。また、シバヤギを用いてパン酵母に特異的なヤギ乳 IgG を調製し、それを抗原として用いたパン酵母とともに添加した飼料でアレルギー自然発症マウスを飼育すると、それらを添加していない飼料で飼育した場合よりもアレルギー症状が軽減することを観察した。また、健常マウスを同様に飼育し、そのマウスのパイエル板細胞から抽出した mRNA の網羅的解析すると、パン酵母とそのヤギ乳 IgG を含む飼料で飼育することにより、それら無添加飼料での飼育の場合よりも B 細胞、ヘルパー T 細胞および抗原提示細胞の分化に関係するタンパク質の mRNA 発現が低下することを明らかにした。なお、免疫ミルクがアレルギーを軽減したという臨床的報告はなされているが、その軽減効果に抗原とその牛乳 IgG の複合体が関係するという報告は国の内外を問わず申請者の関係した報告以外にはなかった。

## 2. 研究の目的

酵母とそのシバヤギ乳 IgG の混合物がアレルギー症状を軽減することは既に確認している。しかし、シバヤギで調製した IgG の量が少なかったため、IgG 単独や酵母単独でアレルギー症状が軽減するか否かは明らかでない。そこで、本研究の目的は次の4点である。①ビール酵母を乳牛に免疫して大量のビール酵母に対する牛乳抗体を調製すること、②ビール酵母単独、その牛乳抗体単独、およびビール酵母と牛乳抗体の混合物を含む飼料で I 型アレルギーマウスを飼育した場合のアレルギー症状を比較し、アレルギー軽減作用は酵母と（抗原）とその牛乳抗体が共存する場合のみ生じることを確認すること、③ビール酵母と牛乳抗体の混合物によるアレルギー軽減機構を明らかにすること、④ビール酵母と牛

乳抗体の混合物の急性毒性を調べること。

## 3. 研究の方法

パン酵母とそれに対するヤギ乳抗体は、マウスにおいて I 型アレルギー症状を軽減することは研究開始当初の背景として述べた。本研究において、パン酵母に対する牛乳抗体を大量に調製し、それを材料に用いることを考えていた。しかし、免疫する乳牛がパン酵母を添加した飼料で飼育されていたために、パン酵母では経口免疫寛容により牛乳中の抗体力価が上昇しない可能性がある。そのために、本研究ではパン酵母の代わり、パン酵母同様に食経験の豊かなビール酵母を抗原に用いた。なお、抗原にビール酵母よりも乳酸菌を用いる方が食品としてのイメージが良い。しかし、乳酸菌の場合は摂取した牛乳抗体が腸内乳酸菌と反応して腸内菌叢を乱す可能性があり、乳酸菌を用いなかった。各年度の研究方法は次のとおりである。

平成22年度：ビール酵母単独やビール酵母に対する牛乳抗体単独ではなく、それらの混合物のみが I 型アレルギーを軽減することを明らかにすることが目的であった。そのため、①ビール酵母に対する牛乳抗体を大量に調製した。②ビール酵母単独、ビール酵母に対する牛乳抗体単独、およびビール酵母とその牛乳抗体を添加した飼料で I 型アレルギー自然発症マウスを飼育して、アレルギー症状を比較した。③各群のマウスの血液、脾臓および腸管を採取し、それらの IgE レベルを ELISA で調べると共に、免疫細胞割合や機能をパーソナルセルファンクションアナライザーで調べた。④脾臓細胞から抽出した mRNA を DNA マイクロアレイに供することにより、免疫系に関係する遺伝子の変動を解析した。

平成23年度：ビール酵母とその牛乳抗体の I 型アレルギー軽減機構を明らかにすることが目的であった。そのため、C3H/HeN 系マウスの脾臓やパイエル板細胞にビール酵母単独、牛乳抗体単独、およびそれらの混合物を加えて培養し、剤溶液中の各種細胞割合や機能をパーソナルセルファンクションアナライザーで調べた。また、細胞から mRNA を抽出し、アレルギー関連遺伝子の発現を定量的 PCR で調べた。

平成24年度：ビール酵母とその牛乳抗体を機能性食品素材として用いることを最終目標にしていることから、ビール酵母と牛乳抗体の急性毒性試験を調べることが目的であった。そのため、6週齢 ICR マウス雌雄各5匹を一群とし、4時間絶食を行った後に、滅菌生理的食塩水に溶解（懸濁）させたビール酵母、

ビール酵母に対する牛乳抗体またはそれらの混合物（各試料のマウス一匹あたりへの投与量は1000mg/マウス体重kgまたは2000mg/マウス体重kg）をゾンデにより胃に単回投与した。投与後14日間、毎日、マウスの行動や皮膚の状態を観察した。また、投与後7日目および14日目に体重を測定を行い、14日目の測定後、エーテル麻酔下でマウスを安楽死させ、剖検を行った。剖検後ただちに各臓器の重量や外観を調べると共に、血液成分の生化学的分析を行い、毒性の有無を判定した。

#### 4. 研究成果

先天的 I 型アレルギー発症モデルマウスである NC/Nga マウスおよびコナヒョウダニ抗原で後天的に I 型アレルギーを誘導した BALB/c マウスをビール酵母添加飼料、牛乳抗体添加飼料、それらの混合物添加飼料およびビール酵母も牛乳抗体も添加していない飼料（無添加飼料）で飼育すると、両系統のマウスともに混合物添加飼料での飼育においてのみ無添加飼料での飼育の場合と比べて、アレルギー症状が軽減した。それら飼料で飼育したマウスの血清 IgE レベルに有意な違いはなかったが、混合物添加飼料で飼育した NC/Nga マウスの脾臓  $Fc\epsilon R1\alpha^+$ CD117<sup>+</sup>細胞数が無添加飼料で飼育の場合よりも有意に減少し、STIM1 の mRNA 発現が明らかに低下した。

一方、パイエル板細胞培養系において、IgE レセプターのサブユニット鎖や脱顆粒に関与するタンパク質を合成する遺伝子発現が混合物を添加することにより顕著に低下することを確認した。

さらに、ビール酵母および牛乳抗体を 1,000mg/kg および 2,000mg/kg 経口投与した ICR マウスの増体重、臓器重量および血清成分と、非投与のマウスのそれらとの間に有意な違いは殆ど認められなかった。これらの結果は、ビール酵母とその牛乳抗体の混合物は安全な抗アレルギー食材であることを示唆している。

#### 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 3 件）

- ① 森崎健太郎, 松田孝裕, 須賀正喜, 荻田佑, 平松浩二, 下里剛士, 大谷 元, ビール酵母とその牛乳抗体のマウスにおけるアレルギー軽減作用と急性毒性に関する検討, 北信越畜産学会報, 第 106 号, 35-47, 2013, 査読有
- ② 大谷 元, 牛乳および乳製品の免疫科学的研究の展開, ミルクサイエンス, 60 巻,

199-206, 2011, 査読有

- ③ Sekimura Y, Shimosato T and Otani H, Anti-allergic effects of a mixture of *Saccharomyce cerevisiae* and its specific goat's milk immunoglobulin G-rich fraction on ovalbumin-sensitized BALB/c mice, *Milchwissenschaft*, 66, 7-10, 2011, 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 長谷川実希, 内田健志, 川西 貴, 下里剛士, 大谷 元, ウシ後期初乳の抗腫瘍作用に関する検討, 第 116 回日本畜産学会大会, 2013 年 3 月 30 日, 広島
- ② 長谷川実希, 遠見和幸, 内田健志, 川西貴, 下里剛士, 大谷 元, ウシ後期初乳の新規生体防御機能の探索, 第 115 回日本畜産学会大会, 2012 年 3 月 28 日, 名古屋
- ③ 遠見和幸, 須賀正喜, 内田健志, 川西 貴, 下里剛士, 大谷 元, ウシ後期初乳中の抗アレルギータンパク質の探索, 第 115 回日本畜産学会大会, 2012 年 3 月 28 日, 名古屋
- ④ 森崎健太郎, 松田孝裕, 岡田 実, 堀江健二, 金武祐, 下里剛士, 大谷 元, ビール酵母とその牛乳抗体のマウス I 型アレルギーに及ぼす影響, 第 115 回日本畜産学会大会, 2012 年 3 月 28 日, 名古屋
- ⑤ 大谷 元, ミルク成分の免疫科学的研究の展開, 日本酪農科学会創立 60 周年記念シンポジウム (招待講演), 2011 年 9 月 22 日, 仙台
- ⑥ 遠見和幸, 清水 努, 内田健志, 為定 誠, 下里剛士, 大谷 元, ウシ後期初乳および常乳のマウス I 型アレルギーに及ぼす影響, 第 114 回日本畜産学会大会, 2011 年 8 月 26 日, 十和田
- ⑦ 大谷 元, 牛乳タンパク質とその消化により生じるペプチドの免疫調節機能の特性付けと利用性, 日本農芸化学会東北支部シンポジウム (招待講演), 2011 年 7 月 9 日, 弘前

〔図書〕（計 4 件）

- ① 大谷 元, 文永堂出版, 畜産学入門 (唐澤 豊・大谷 元・菅原邦生編), 2012, pp33~42
- ② 大谷 元, 斎藤忠夫, 日本酪農科学会, 日本酪農科学会創立 60 周年記念誌, 2011, pp.218-232
- ③ 大谷 元, 食品資材研究会, 母乳の力: 母乳タンパク質に秘められた生体防御機能, 2011, 183 頁
- ④ 大谷 元監修, 日東書院, ナチュラルチ

ーズ事典, 2010, 207 頁

[その他：ホームページ]

[http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/otani/j\\_index.html](http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/otani/j_index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大谷 元 (OTANI HAJIME)

信州大学・農学研究科・教授

研究者番号：30109201

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号