

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 22 日現在

機関番号：35307

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700863

研究課題名(和文)腸管免疫賦活作用をターゲットとした米抽出物によるアレルギー予防の研究

研究課題名(英文)A study on rice extract potentiating intestinal immune system for prevention of allergy.

研究代表者

川上 賀代子 (Kawakami, Kayoko)

就実大学・薬学部・助教

研究者番号：00505935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管には特殊な免疫組織であるパイエル板が点在し、産生される免疫グロブリンA(IgA)が、腸管免疫において重要な役割を果たしている。そこで、IgA産生亢進作用を指標として評価を行った結果、玄米タンパク抽出物(BRE)の高分子画分にIgA産生亢進作用があることを見出した。また、卵白アルブミンでアレルギーを惹起したマウスにBREを摂取させると、脾臓細胞のIFN- γ 産生量は濃度依存的に上昇し、Th1/Th2バランスが有意に上昇していた。さらに、OVA特異的IgEは濃度依存的に低下していた。以上の結果から、BRE摂取により、アレルギー改善効果が期待できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The prevention or modulation of immune response through the regulation of Th2 type helper T cell differentiation is recently demonstrated to attenuate symptoms which related to allergy. Here, we investigated the effect of brown rice extracts (BRE) on IFN- γ production from mice splenocytes. The treatment of BRE dose-dependently increased IFN- γ . In order to determine the active component, we separated BRE by ultrafiltration. High molecular weight fraction enhanced IFN- γ production. We further examined whether oral administration of BRE could have a beneficial effect on immune system in ovalbumin (OVA)-immunized mice. The oral administration of BRE dose-dependently induced IFN- γ production by splenocytes. Total and OVA-specific IgE in serum of mice, which were administrated BRE, was lower than that of the OVA-immunized mice. These results suggest that BRE might improve the Th1/Th2 balance toward Th1 dominance.

研究分野：食品機能学

キーワード：食品機能 米 腸管免疫 パイエル板 Th1/Th2

1. 研究開始当初の背景

我が国では、米の生産力(1400万トン/年)が需要量(950万トン/年)を大幅に上回り、減反や転作に莫大な費用が投じられ、生産調整が行われている。したがって、この余剰米の有効活用方法が待望されている。申請者の所属機関では、これまで大部分が廃棄処分されていた米糠を食品用途として活用するために、含まれる有用成分を使用可能な方法で抽出して機能性ペプチドを調製し、健康食品用途として実用化する研究を行っている。近年、喘息、花粉症、食物アレルギーなどのアレルギー疾患の罹患率は、先進国を中心として増加傾向にある。現在、我が国でも小児の約3割が何らかのアレルギー疾患に罹患しており、社会問題になっているため、その予防と対策は、国民の最大の関心事のひとつである。

そこで食品の免疫調節機能が注目を集めており、中でも食品成分が実際に接する腸管免疫系に食品成分が作用していると考えられている。腸管にはパイエル板のような特殊な免疫組織が点在し、パイエル板から産生される免疫グロブリン A (IgA) が、腸管免疫において重要な役割を果たしている。IgA は体内に侵入した有害微生物や病原菌の生体内への侵入を防いでおり、IgA の低下がアレルギー疾患の発病に関連しているという報告がある (*Pediatr Allergy Immunol.* 16:65-71.(2005))。

そこで、農産物および食品成分から、腸管免疫賦活作用をもつ成分を探索した。その結果、凍結乾燥マイタケの熱水抽出物に腸管免疫賦活作用があることを発見し、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚症状を改善することを特許申請している(特願2010-048296)。また、申請者の所属機関所有の米関連製品をスクリーニングした結果、玄米タンパク抽出物(米国産)にパイエル板細胞の IgA 産生誘導活性があり、その成分が分子量 3000 以上の成分であることを明らかにしている。

前述の通り、玄米タンパク抽出物にマウスパイエル板細胞の IgA 産生亢進作用があることを確認しているが、その活性成分の同定には至っていない。また、米は加工方法により、玄米、発芽玄米、米糠、白米など様々な形態が考えられるが、腸管免疫賦活作用を示す成分が最も含まれている形態が何であるのかについても明らかとなっていない。

これまで腸管免疫賦活作用をもつ食品成分として、キノコに含まれる β -グルカンなどの多糖類(特公昭 49 - 484 号公報)、乳酸菌や酵母などの食用微生物やその細胞壁成分 (*Biol Pharm Bull.*, 33:289-93.(2010))、フラクトオリゴ糖 (*Clin Exp Immunol.*, 137:52-8(2004))、ラクトリペプチド (*Biosci Biotechnol Biochem.*, 67:729-35.(2003)) などが報告されている。また、米由来の免疫賦活活性成分に関しては、米糠アラビノキシラ

ン誘導体にナチュラルキラー(NK)細胞やマクロファージを活性化するという報告(*J Pharm Pharmacol.*, 56:1581-8.(2004))があるが、米由来のタンパクやペプチド成分が腸管免疫に与える影響に関してはまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、余剰米の有効活用方法として、米由来のタンパクや酵素分解ペプチドの腸管免疫系に関わる機能について、IgA 産生亢進作用を指標として評価を行い、最終的には、米由来の機能性食品素材の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 米タンパク抽出物、酵素分解物の調製
蒸留水 40 mL と玄米タンパクを 2.5、5、10% (w/v) になるように懸濁し、pH を 5 N NaOH により pH 7 に調整した。懸濁液は、40、750 rpm、0.5~15 hr 抽出した。その後、80、30 min 加熱抽出を行い、遠心分離(2000×g、20 min、4)し、得られた上清を凍結乾燥し、玄米タンパク抽出物を得た。

調製したタンパク抽出物、酵素分解物はゲルろ過カラムにより分析を行い、酵素分解物が生成しているか確認した。

(2) マウスパイエル板細胞の IgA 産生誘導活性の評価 (*in vitro*)

BALB/c マウスから小腸パイエル板細胞を単離し、(1)で調製した米タンパク抽出物や酵素分解ペプチドを 0 - 100 μ g/mL の濃度で添加して培養を行った。培養 7 日目に培地上清を回収し、ELISA 法によって IgA 産生量を測定し、腸管免疫賦活作用を評価した。また、調製した抽出物、酵素分解物がパイエル板細胞の生存率に影響を及ぼすかどうか MTT 法によって評価した。

(3) 米タンパク抽出物の経口摂取がマウスに及ぼす影響の評価 (*in vivo*)

(2)で活性の高かった米タンパク抽出物を BALB/c マウスに 21 日間経口投与し、経日的に糞を採取した。最終日に採血と解剖を行い、パイエル板細胞、脾臓細胞を培養した。培地上清中の IgA や各種サイトカイン(インターフェロンガンマ (IFN- γ)、インターロイキン (IL)4、IL-12) 糞中や血中の IgA を ELISA 法により測定し、腸管免疫賦活作用を評価した。

(4) 食物アレルギーモデルマウスを用いた抗アレルギー作用の評価 (*in vivo*)

BALB/c マウスに米タンパク抽出物を 28 日間経口投与する。投与開始 14 日目と 21 日目に卵白アルブミン(OVA)を腹腔内投与し、アレルギーを惹起した。経日的に糞を採取し、最終日には採血と解剖を行った。パイエル板

細胞、脾臓細胞を培養し、培地上清中の IgA、IgE や各種サイトカイン、糞中の IgA や血中の IgA、IgE を ELISA 法により測定し、アレルギー症状の改善がみられるか評価した。

4. 研究成果

(1) 米タンパク抽出物、酵素分解物の調製

日本産玄米、発芽玄米、米糠、米国产玄米からタンパク抽出物の調製を試みた。ゲルろ過カラムを用いて分子量分布を調べたところ、各抽出物によってピークパターンが異なり、米糠抽出物に低分子のものが多く含まれていることが分かった。また収率は約 6% であった。玄米タンパクを各種酵素（ビオプラゼ SP、ウミザイム G、ペプチダーゼ R、フレーバーザイム、デナチーム）で処理し、玄米ペプチドを作成した結果、デナチーム処理ペプチドの収率が約 60% と最も高かった。

(2) マウスパリエル板細胞の IgA 産生誘導活性の評価 (in vitro)

(1) で調製した米タンパク抽出物と玄米ペプチドを 0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でマウスパリエル板細胞に添加して培養を行った結果、15hr、5% 濃度で抽出した米国产玄米タンパク抽出物の IgA 産生活性が最も高いことが明らかとなった。しかし、玄米タンパク抽出物を酵素処理した玄米ペプチドでは IgA 産生活性がみられなくなった。

(3) 活性成分の同定

IgA 産生誘導活性の認められた米国产玄米タンパク抽出物を限外ろ過膜により分画し、活性成分の同定を試みた。抽出物を分子量 30,000、10,000、3,000 で分画し (図 1) マウスパリエル板細胞の IgA 産生量を調べた結果、分子量 30,000 以上の画分に活性があることが明らかとなった。さらに、分子量 30,000 以上の画分をゲル濾過カラムで分画し、各フラクション中のタンパク量と全糖量を調べた。その結果、タンパクは Fr.13、糖は Fr.26 に最も多く含まれていることがわかった。各フラクションの IgA 産生量を調べた結果、Fr.11 から Fr.14 と Fr.25 から Fr.27 に活性成分が含まれていると予想された。

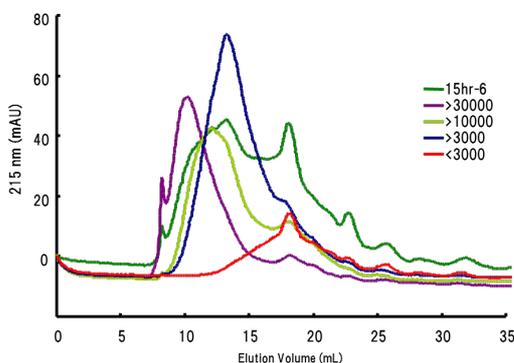


図 1 玄米タンパク抽出物限外ろ過膜画分のゲルろ過分析

(4) マウスを用いた腸管免疫賦活作用の評価 (in vivo)

マウスに玄米タンパク抽出物の高分子画分を 20 mg/kg または 200 mg/kg の投与量で 3 週間経口投与を行った。体重の群間差は認められず、玄米タンパク抽出物摂取による体重への影響はなかった。糞中の IgA 量を測定した結果、20 mg/kg 投与群でコントロール群に比べて IgA 量が高い傾向がみられた。また、パリエル板細胞培養上清中の IgA 量は 20 mg/kg 投与群でコントロール群に比べて IgA 量が高い傾向がみられた。IL-12 や IL-6 産生量はコントロール群に比べて玄米タンパク抽出物投与群で上昇していた。脾臓細胞上清中の IFN- γ 産生量はコントロール群に比べて上昇傾向を示しており、一方、IL-4 は低下傾向を示し、Th1/Th2 バランスも上昇していることから、玄米タンパク抽出物摂取により、アレルギー改善効果が期待できると考えられた。

(4) 食物アレルギーモデルマウスを用いた抗アレルギー作用の評価 (in vivo)

マウスにおいてアレルギー改善が期待できることが分かったので、OVA を腹腔内投与してアレルギーを惹起したマウスを用いて検討を行った。マウスに玄米タンパク抽出物の分子量 30,000 以上の画分を 2、20 mg/kg の投与量で 24 日間経口投与を行った。10 日目と 17 日目に OVA を腹腔内投与し、アレルギーを惹起した。

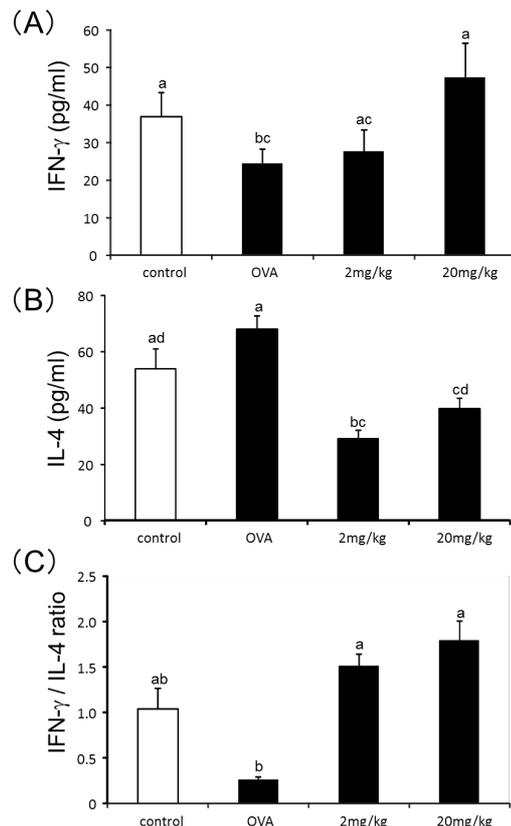


図 2 脾臓細胞上清中の IFN- γ (A) IL-4 (B) 産生量と Th1/Th2 バランス (C)

糞中とパリエル板細胞培養上清中のIgA量を測定した結果、コントロールと比較して有意な上昇はみられなかった。一方、脾臓細胞上清中のIFN- γ 産生量はコントロール群に比べて濃度依存的に上昇した。また、IL-4は低下しており、Th1/Th2バランスが有意に上昇していた(図2)。さらに、OVA特異的IgEは濃度依存的に低下していた。以上の結果から、玄米タンパク抽出物の高分子画分摂取により、アレルギー改善効果が期待できることが示唆された。

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1件)

Kayoko Kawakami, Chie Moritani, Misugi Uraji, Akiko Fujita, Koji Kawakami, Tadashi Hatanaka, Etsuko Suzaki, Seiji Tsuboi, Hepatoprotective effects of rice-derived peptides against acetaminophen-induced damage in mice., *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 査読有, *in press*.

[学会発表](計11件)

川上賀代子、加藤春華、垣内紗恵子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二、酒粕ペプチドのアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用、日本農芸化学会 2016 年度大会、北海道 2016 年 3 月 27-30 日

川上賀代子、守谷智恵、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二、米由来ペプチドのアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 兵庫、2015 年 12 月 1-4 日

川上賀代子、加藤春華、守谷智恵、戸羽光世、平本和義、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、洲崎悦子、坪井誠二、酒粕由来ペプチドの肝障害抑制作用、第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、高知、2015 年 10 月 31 日、11 月 1 日

Kayoko Kawakami, Chie Moritani, Misugi Uraji, Yoshikazu Inoue, Akiko Fujita, Koji Kawakami, Tadashi Hatanaka, Etsuko Suzaki, Seiji Tsuboi, Protective effects of rice peptides on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice., ACN2015 (12th Asian Congress of Nutrition), Kanagawa, 2015 年 5 月 14-18 日

川上賀代子、守谷智恵、戸羽光世、平本和義、裏地美杉、井上良計、藤田明子、川上晃司、畑中唯史、坪井誠二、酒粕由

来ペプチドの抗酸化作用について、第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、広島、2014 年 11 月 8-9 日

Kayoko Kawakami, Chie Moritani, Misugi Uraji, Yoshikazu Inoue, Akiko Fujita, Koji Kawakami, Tadashi Hatanaka, Seiji Tsuboi, Antioxidant effect of rice peptides via elevation of the intracellular glutathione levels., International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Niigata, 2014 年 10 月 30-31 日

Kayoko Kawakami, Hitomi Mori, Misugi Uraji, Tadashi Hatanaka, Hideyuki Ito, Effect of brown rice extracts on immune response in OVA-immunized mice., ISNFF 2013 Annual Conference & Exhibition, Taipei, Taiwan, 2013 年 11 月 5-9 日

Kayoko Kawakami, Hitomi Mori, Misugi Uraji, Masayo Kimura, Tadashi Hatanaka, Hideyuki Ito, Brown rice extracts enhance intestinal immune functions in mice., The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health, Niigata, 2012 年 10 月 15-17 日

Kawakami, Hitomi Mori, Misugi Uraji, Masayo Kimura, Tadashi Hatanaka, Hideyuki Ito, Immuno-regulatory effects of brown rice extracts., Bioactive Okayama 2012, Okayama, 2012 年 09 月 13-14 日

森ひとみ、川上賀代子、畑中唯史、伊東秀之、玄米抽出物の免疫調節作用に関する研究(2)、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、宮城、2012 年 05 月 18-20 日

川上賀代子、森ひとみ、熊谷祐也、臼木博一、向原隆文、畑中唯史、伊東秀之、玄米抽出物の免疫調節作用に関する研究(1)、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、宮城、2012 年 5 月 2012 年 05 月 18-20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 賀代子 (KAWAKAMI, Kayoko)

就実大学・薬学部・助教

研究者番号：00505935