

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24658126

研究課題名（和文）糠床に含まれる自然免疫を賦活化する発酵生成成分の探索

研究課題名（英文）Exploration of components that may stimulate innate immune responses in traditional fermented products

研究代表者

扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80300820

研究成果の概要（和文）：本研究は、自然免疫応答を活性化する成分を糠床から探索することを目的として行った。糠床を水抽出後分画した画分と、水抽出後の残渣をエタノール抽出した画分を調整した。水抽出物をマウスに経口投与後、肺炎球菌を感染させると、マウスの生存率が30%から50%に改善された。一方、エタノール抽出物投与では、生存率の改善が見られなかった。糠床の抽出物を細胞培養等に加える *in vitro* 実験を行ったところ、いくつかの画分に以下の活性を認めた：1) 肺胞マクロファージ貪食活性促進、2) TNF- α 、IL-1 β および IL-12 の産生誘導、3) TLR3 および MARCO の遺伝子発現促進、4) インフルエンザウイルスの増殖抑制、5) 肺炎球菌に対する直接障害。これらの結果から、糠床には、自然免疫を活性化し、あるいは細菌やウイルスを抑制する成分が含まれている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The study aims at exploring components that stimulate innate immune response in Nukadoko, salted rice bran paste for pickling. Nukadoko was extracted with water and fractionated into some fractions. The residue was subsequently extracted with ethanol. Mice were orally given the extracts, followed by infection with pneumococcus. The survival rate of pneumococcal infected mice increased from 30% to 50% by oral administration of the water extract, while the survival rate was not improved by the administration of ethanol extract. An addition of the extracts to cell culture demonstrated that some fractions had the following activities, 1) Enhancement of phagocytosis of MH-S (a murine alveolar macrophage cell line), 2) Induction of TNF- α , IL-1 β , and IL-12 in MH-S, 3) Elevation of TLR3 and MARCO gene expression in MH-S, 4) Inhibition of influenza virus amplification in A549 (an adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line), 5) Direct anti-pneumococcal effect. These results suggest that the Nukadoko may include some component that may enhance innate immune response and suppress pneumococcal infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：食品機能

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の進展にともない、またインフルエンザ等の新興・再興感染症の世界的な勃発の危険性がある中で、細菌性肺炎等の高齢者の感染症を予防することは喫緊の課題となっている。機能性食品として日常的に安全に摂取することができ、免疫能を促進する食品成分を見出すことができれば、高齢者の感染症を予防する上でたいへん望ましいと考えられる。

そこで今回着目したのは、糠漬けに使用した後の糠床である。

我々は最近、免疫能を促進する植物性乳酸菌の選定およびその発酵食品の開発に関わり、開発した発酵食品がマウスやヒトの試験においてNK細胞やマクロファージの機能を高めることを明らかにした。

これらの結果から、乳酸菌発酵生成物の宝庫である糠床に、さらに効果の高い免疫促進物質が含まれると確信した。

糠床に含まれる免疫促進物質を同定し、高齢者に摂取させて自然免疫能を改善し感染症を予防することを目的として、基礎検討を行う。

2. 研究の目的

発酵食品が免疫能を高めるという報告は多数があるが、その活性成分を同定したという報告は少ない。本申請では、糠漬けが終了した糠床から、マクロファージの食食能を向上させる活性成分を分離・同定し、その感染防御における効果と機構をマウスモデルで検証

することを目的とする。

本研究の成果は、免疫機能が低下したハイリスク者に投与することで、耐性菌出現を招く抗菌剤の使用を減らして感染を予防する、新しい機能性食品、医薬品の開発につながる可能性がある。

また、免疫低下した高齢者の感染症を予防する目的で、免疫を促進する物質を安全な食品から見出して実用化すれば、高齢者の医療費抑制にもつながると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 糠床抽出物からの成分抽出と分画

糠床の水抽出液をいくつかの画分(f1, f2, f3...)を得た。さらに、水抽出後の残渣からエタノール抽出物(E)を回収した。

(2) In vivo 実験における、活性成分の肺炎球菌感染防御効果

マウスを、糠床の水抽出液を飲水に1%添加して摂取させた群と、通常飲水のみを対照群の2グループに分けた。摂取開始後7日目に肺炎球菌感染を感染させ、生存率を比較した。

(3) In vitro 実験における抽出成分の免疫賦活効果

マウス肺胞マクロファージ細胞株(MH-S)の培養液に上記の各画分f9-16あるいはEを0.1%添加して1日培養し、以下の検討を行った。

① 食食能

- ② サイトカイン産生
- ③ TLR3、TLR4、スカベンジャーレセプター-MARCO の遺伝子発現

(4) インフルエンザウイルス増殖抑制

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 (A549) の培養液に各抽出液画分を 0.1% 添加して 1 日培養後、インフルエンザウイルス (PR8 株) を感染させ、24 時間後に培養液中に放出されているウイルスをプラーク法で測定した。

(5) 抗肺炎球菌活性

肺炎球菌浮遊液に各抽出液画分を 0.1% 添加して 30 分室温放置後、血液寒天培地に塗抹し、48 時間後に出現したコロニー数を数えた。

4. 研究成果

肺炎球菌感染防御効果

水抽出液摂取群は、生存率が 50% となり、対照群の 30% と比較して、生存率改善効果が認められた (図 1)。エタノール抽出液摂取による生存率改善効果は認められなかったため、経口摂取により効果が期待できる有効成分は水抽出液に含まれていると考えられる。次に各画分をそれぞれ摂取させて同様の感染試験を行い、生存率改善に寄与する画分を明らかにしたい。

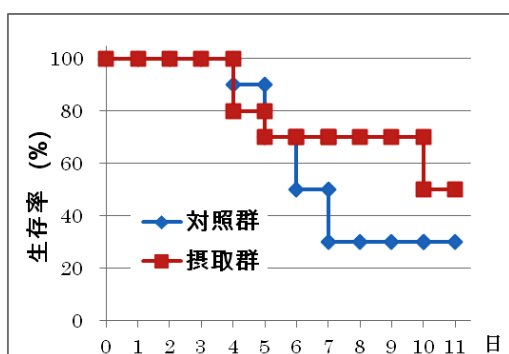


図 1 水抽出液摂取によって肺炎球菌感染時の生存率が改善した

抽出成分の免疫賦活効果

マウス肺胞マクロファージ株に対して以下のような効果が認められるいくつかの画分を得た。

(1) 食食能促進 (図 2)

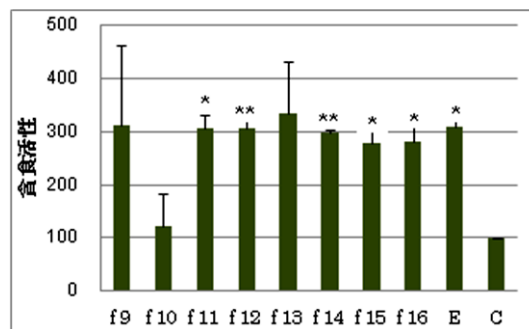


図 2 多くの画分で肺胞マクロファージの食食活性が認められた

(2) サイトカイン産生誘導

TNF- α 、L-1 β 、IL-12 の産生を高めるいくつかの画分を得た。

(3) 遺伝子発現亢進

TLR3、MARCO の発現を促進する画分が認められた。

以上の結果から、糠床にはマクロファージ刺激物質が多種存在すると考えられた。

インフルエンザウイルス増殖抑制

A549細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖は、ある画分の添加によって10分の一程度に低下した(図3)。いずれも抽出画分によるA549細胞への障害は認められなかった。これらの画分には、ウイルス増殖のいずれかの段階を抑制する物質が含まれている可能性がある。

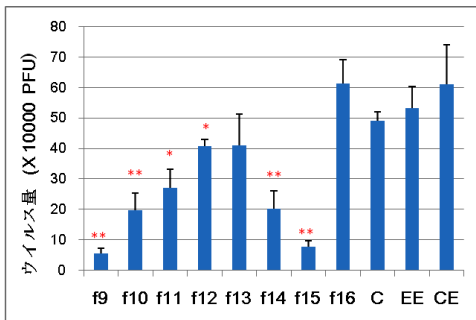


図 3 インフルエンザウイルス増殖抑制効果のある画分が認められた

抗肺炎球菌活性

肺炎球菌のコロニー出現数を抑制する画分が認められた(図4)。この画分には直接肺炎球菌を阻害する物質が、含まれていると考えられた。

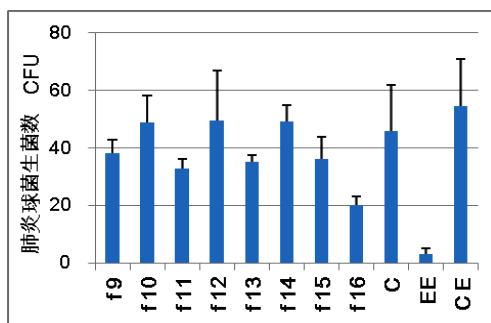


図 4、肺炎球菌を阻害する画分が認められた

有効画分については、Superdex Peptide、逆相HPLC、イオン交換 (DEAM, SP) HPLCによりさらに分画し、活性の見られたピークを分取し、組成分析、ESI-MS/MS、NMR、ペプチドシーケンサーにより構造を同定する予定である。作用機序の解明については、免疫細胞への作用 (食食能、遺伝子発現パターン、サイトカイン産生、ケモカイン産生、NO産生、TLRシグナル伝達、細胞表面マーカーの変化) 等を分析する。

5. 主な発表論文等

なし

[産業財産権]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80300820

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松田 修 (MAZDA OSAM)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00271164

佐藤 健司 (SATO KENJI)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00202094