

私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：新規加工・発酵醸造食品の機能性評価

プロジェクトでの役割：アンチエイジング効果、免疫力向上などの健康増進効果の評価

研究タイトル：①ヒトの培養細胞でのアンチエイジング効果の評価法

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 細胞生物学研究室

担当者職名：教授 大坪素秋

1. 研究の目的

我が国において近年大きな社会問題となっている糖尿病やがんをはじめとする生活習慣病の増加には食生活の欧米化に伴う質的变化が大きくかかわっていることが以前から指摘されている。近い将来、超高齢化社会の到来により生活習慣病のさらなる増加が予想され、少子高齢化とそれに伴う医療費の負担増により国の財政赤字の悪化を加速させることが持続可能な社会にとっての大きな課題となっている。

一方で 2013 年 12 月に和食がユネスコの無形文化遺産に登録され、長寿国日本の伝統的食習慣である和食の健康面での有効性が見直されており、世界的に注目を集めている。その中でも和食に欠かせない、酵母、麹菌や乳酸菌などの発酵微生物を利用して製造される発酵醸造食品の健康機能性が特に注目され、海外での日本食・日本酒ブームにつながっている。しかしながら、これら発酵醸造食品についての有効性の科学的評価については十分な解析が行われておらず、ヒトの健康面への影響については不明な点が残されている。

本研究課題において、大分県産の農林水産物やそれらを原料とした発酵醸造食品の健康機能性評価のためにヒト培養細胞を用いた実験を行い、それら食品に含まれる健康機能性成分のうちアンチエイジング効果や免疫力向上などの健康増進効果の科学的評価法の確立を行う。本評価システムの確立により、発酵醸造食品とそれに含まれる成分の健康機能性における有効性についての科学的判定が容易になり、より付加価値の高い製品開発が可能となることで地域貢献につながることを期待される。

2. 研究内容

発酵食品中にアンチエイジング効果を有する機能性成分が含まれているか評価するために、ヒトの培養細胞の系を用いて、アンチエイジングにおいて重要な細胞小器官であるミト

コンドリアの健康度が標的マーカーとして利用できるのではないかと考え、ヒトの培養細胞内において蛍光試薬により生きた状態で可視化して蛍光顕微鏡で観察することでアンチエイジング効果を評価する方法を本研究課題で模索した。細胞のミトコンドリアは外的ストレス因子により障害を受けやすく、さらにそれらの障害が直接細胞に老化促進などの重大な影響を及ぼすと考えられる。生きた細胞のミトコンドリアの可視化についてはすでに様々なミトコンドリア特異的な蛍光試薬が市販されており、それらを利用してミトコンドリアのバイオイメーキングが行われているので、そのうちのマイトトラッカーレッド (Thermo Fisher Scientific Inc.) と GFP-Mito 発現ベクター (pAcGFP1-Mito、 Clontech 社) を購入してヒトの培養細胞の HeLa 細胞内のミトコンドリアの可視化を試みた。

1) GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株の樹立：

まず、ヒトの株化細胞として広く用いられている HeLa 細胞を利用して、生きた細胞のミトコンドリアの可視化を試みた。緑色蛍光タンパク質 (GFP) をミトコンドリアに局在させるシグナルを利用することによりミトコンドリアに GFP を限局させる GFP-Mito 発現プラスミドを HeLa 細胞に遺伝子導入し、GFP-Mito を高発現する HeLa 細胞を薬剤耐性マーカー (G418 耐性) 遺伝子と共発現させて選抜した。遺伝子導入法は、比較的安価な試薬である非脂質性ポリカチオンのポリエチレンイミン (Polyethyleneimine “Max”(MW 40,000)、Polysciences, Inc.) による方法を用いて遺伝子導入に成功し、GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株の樹立に成功した (図 1)。

次に樹立した GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞において GFP-Mito (緑色蛍光) の局在が実際にミトコンドリアを反映しているか、ミトコンドリア特異的な蛍光試薬であるマイトトラッカーレッドで染色して (赤色蛍光)、赤と緑の蛍光画像を重ね合わせて GFP-Mito の局在と一致するか調べることによりミトコンドリア特異的局在を確認できた (図 2)。

以上の観察は本研究機関に既設の倒立型位相差蛍光顕微鏡(Axiovert 135, Carl Zeiss)と CCD デジタルカメラ (DP70, Olympus) を利用して行った。

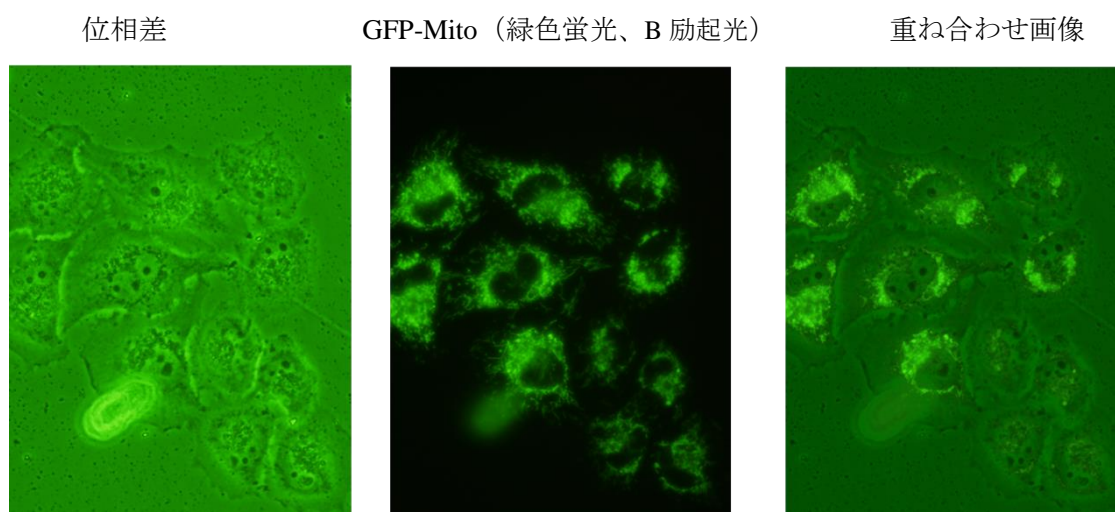


図 1. GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株

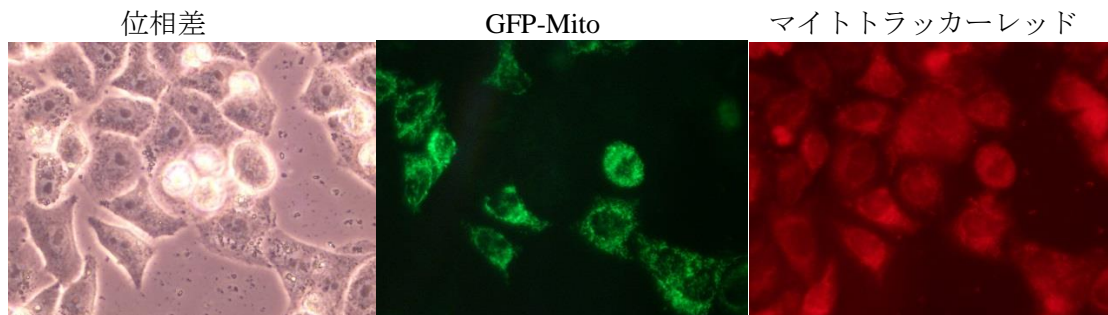


図 2. マイトトラッカーレッドで染色した GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株

2) 生きた細胞のミトコンドリアの動態解析法の確立：

次に GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞におけるミトコンドリアの動態変化を経時的に観察する目的で、CCD デジタルカメラ (DP70, Olympus) を利用したタイムラプスビデオ撮影によるライブイメージング技術の確立を目指した。

CO₂ インキュベータ外で長時間にわたる顕微鏡による観察を実施するため、倒立型位相差蛍光顕微鏡(Axiovert 135)にサーモステージ(Tokai Hit)を組み合わせることにより、細胞培養皿の温度を CO₂ インキュベータ外においても 37°C に保温できるようになり、生理的条件下での長時間にわたる細胞の観察が可能になった (図 3)。このようにサーモステージの導入により CCD デジタルカメラによるミトコンドリアの動態の長時間にわたるタイムラプスビデオ撮影が可能となった。

さらに x63 対物レンズに x2 の光学レンズを組み合わせることによって約 1,300 倍の拡大画像で、微細なミトコンドリアが分裂や融合する様子の動態観察も可能となり、生きた細胞内のミトコンドリアのダイナミックな変化がリアルタイムで追跡可能となった。

生きた細胞でのミトコンドリアの動態解析法の確立により、機能性成分を培養中の細胞に与えることによるミトコンドリアの動態変化を添加前と添加後でタイムラプスビデオのデータとして記録し、比較することが可能となった。

以上のように、GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞と蛍光顕微鏡を駆使して、ミトコンドリアを蛍光試薬で標識して可視化することで、ミトコンドリアの数や形態変化などをもとにしたアンチエイジング効果を生きた細胞で評価するライブイメージングの実験系を樹立できた。また、本研究の過程で、ミトコンドリア機能維持に関する遺伝子が関与する小児疾患のスクリーニング法の研究についての学術論文を共同研究として報告した (*Mol. Genet. Metab.* 2016)。

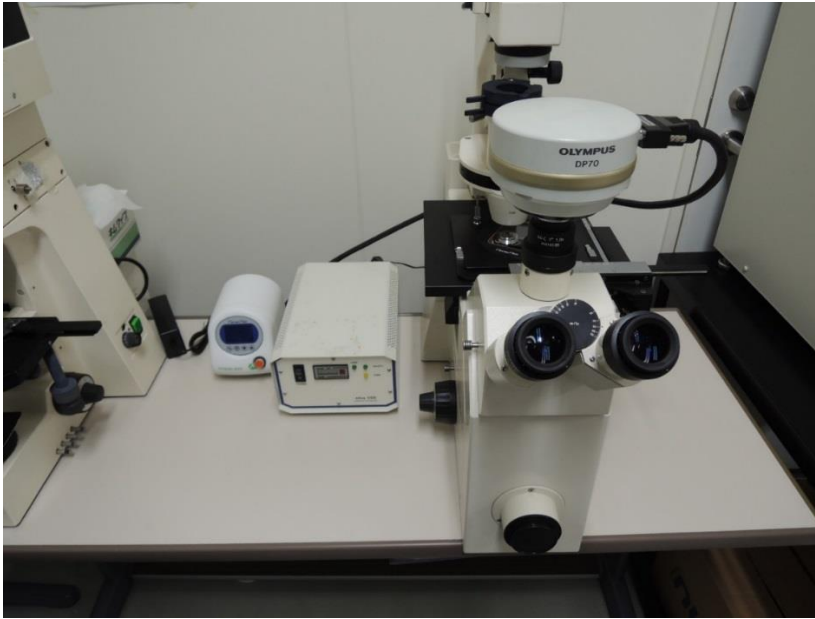


図 3. 倒立型位相差蛍光顕微鏡(Axiovert 135)とサーモステージ(Tokai Hit)の組み合わせ

研究タイトル：②アンチエイジング効果を定量的に評価する系の確立

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 細胞生物学研究室

担当者職名：教授 大坪素秋

1. 研究の目的

アンチエイジング効果を有する化合物としては、細胞にとって有害な活性酸素種 (ROS) を中和できるポリフェノールなどの抗酸化物質 (アンチオキシダント) が一般に知られている。特に植物由来ポリフェノールのレスベラトロールのアンチエイジング効果による健康機能性については、最初酵母やモデル動物での基礎研究によって重要性が明らかになり、その後マスコミ等を宣伝媒体として大きく取り上げられ一般にも知られるようになってきた。一方でアンチエイジング効果を有する化合物の人体への有効性に関しては、十分な研究がヒトを対象として実施されておらず、科学的な確証が得られていない状況である。大分県特産の柑橘類をはじめとする様々な農林水産物にはポリフェノールなどの抗酸化作用を有する化合物が多く含まれており、レスベラトロール類似のアンチエイジング効果が期待できるので、それらの抗酸化作用についてヒトの培養細胞を利用した科学的評価法の確立をめざした。

2. 研究内容

1) ミトコンドリア内の ROS の発生や膜電位のフローサイトメーターによる測定：
その目的で、本研究課題で 28 年度購入したフローサイトメーターの、3 レーザー細胞解析機 (MACSQuant Analyser、ミニサンプル付き、Miltenyi Biotec 社) の活用を計画した (図 4)。フローサイトメーターは様々な蛍光試薬と組み合わせることで細胞のミトコンドリア

内の ROS の発生や膜電位を測定することが可能で、ミトコンドリアの健康度を定量的に調べる事が可能である。また、蛍光顕微鏡での測定と比較して定量性に優れている。そのため食品や食品に含まれる化合物のアンチエイジング効果の指標となる抗酸化活性の強さについて培養細胞を用いた実験により定量的に比較することが可能となる。

細胞内のミトコンドリア内の ROS を検出する蛍光試薬として MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific Inc.) を利用した。MitoSOX™ Red は還元状態では非蛍光であるが、ROS によって酸化されると蛍光強度が増大する。培養している HEK293 細胞に MitoSOX™ Red を最終濃度 5 μ M となるように加えて 37 $^{\circ}$ C、30 分間 CO₂ インキュベータで培養し、その後 H₂O₂ を 1mM 加えてさらに 10 分間培養することで ROS の産生を促して、H₂O₂ を加えていないコントロールとフローサイトメーター (検出波長 585nm、細胞数 10,000) で比較したところ、有意な ROS の産生の増加が H₂O₂ 添加後に認められた (図 5)。

2) ミトコンドリアの容積と膜電位のフローサイトメーターによる測定：

ミトコンドリアの容積や形態をもとにミトコンドリアの健康度を蛍光顕微鏡により評価する方法は定量性に欠けるため、ミトコンドリアの健康度の指標となるミトコンドリア内の ROS や膜電位をフローサイトメーターで測定することによりアンチエイジング効果を定量的に評価する系の検討を行った。

その目的のためフローサイトメーターとミトコンドリア特異的な蛍光試薬を組み合わせで HEK293 細胞で定量的な測定方法を検討した。蛍光試薬としては、ミトコンドリアの容積の測定のためマイトトラッカーレッド、ミトコンドリアの膜電位には JC-1 iodide (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine, iodide)、TMRM (tetramethylrhodamine ethyl ester)、ROS の測定に MitoSOX™ Red をそれぞれ用いた。これら蛍光試薬とフローサイトメーターの組み合わせによりミトコンドリア内の ROS や膜電位を定量できる実験系が確立できたので (図 5)、抗酸化活性などの食品に含まれる成分の細胞への影響を定量的に評価することが可能となった。H₂O₂ 添加後の ROS の産生を、大分県特産の柑橘類をはじめとする様々な農林水産物に含まれる抗酸化作用を有する化合物が実際に抑制する効果があるか今後調べていく。

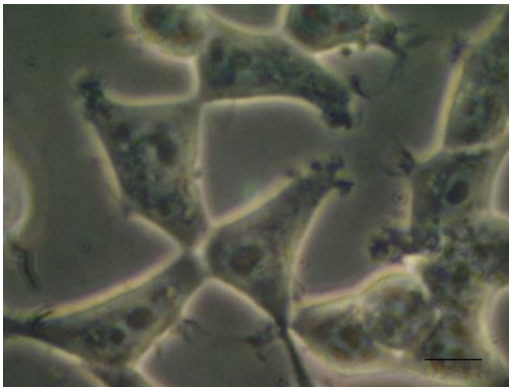


図 4 3 レーザー細胞解析機 (MACSQuant Analyser、ミニサンプル付き、Miltenyi Biotec 社)

無処理

明視野 (位相差)

落射蛍光 (赤色蛍光、G 励起光)

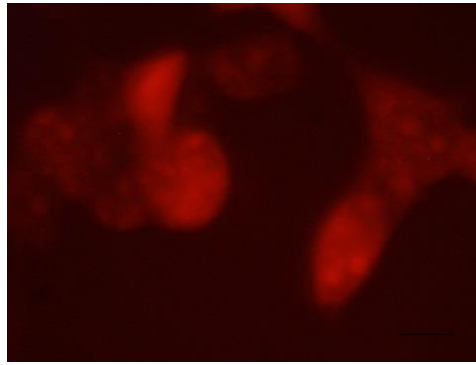
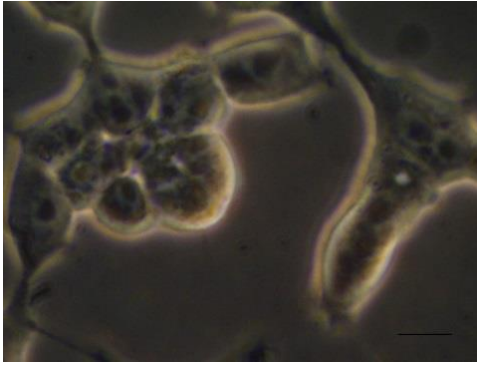


スケールバー : 50 μ m

MitoSOXTM Red

明視野 (位相差)

落射蛍光 (赤色蛍光、G 励起光)

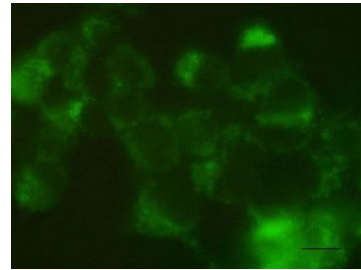
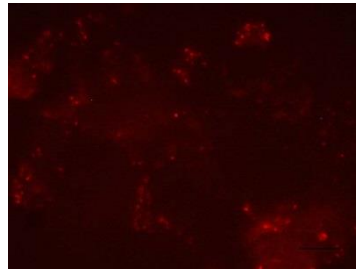
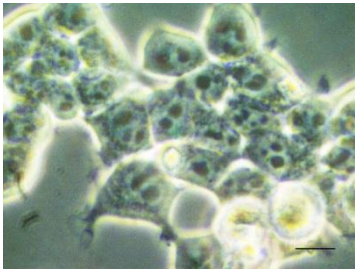


JC-1 iodide

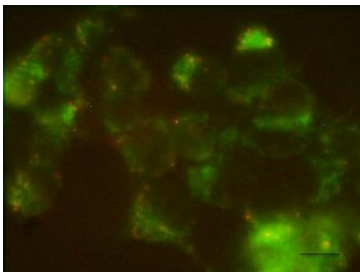
明視野(位相差)

落射蛍光(赤色蛍光、G 励起光)

落射蛍光(緑色蛍光、B 励起光)



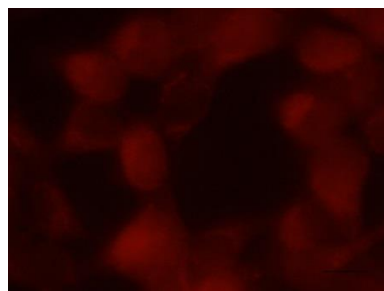
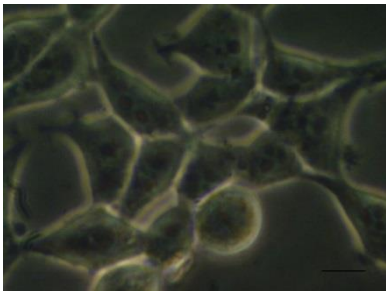
重ね合わせ画像(赤色蛍光、G 励起光、緑色蛍光、B 励起光)



TMRM

明視野(位相差)

落射蛍光(赤色蛍光、G 励起光)

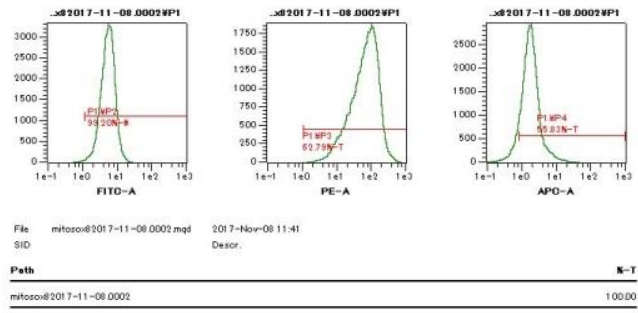
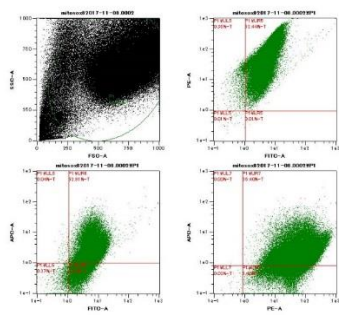


MitoSOX™ Red 8μl (5μM)

525nm(FITC)

585nm(PE)

655-730nm(APC)

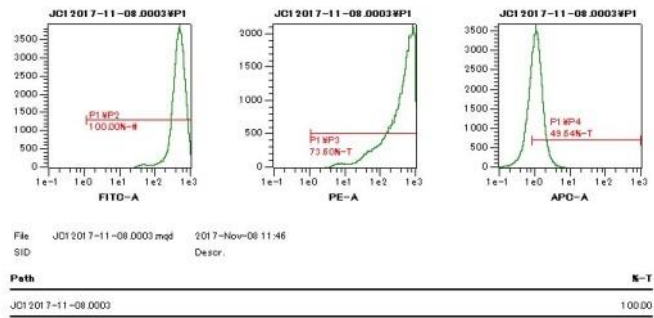
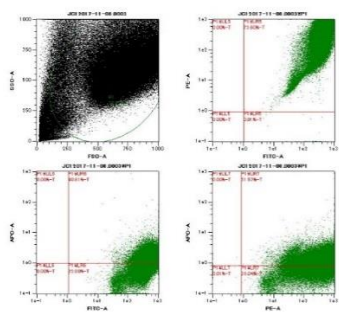


JC-1 iodide 1 μ l (0.5 μ g/ml)

525nm(FITC)

585nm(PE)

655-730nm(APC)

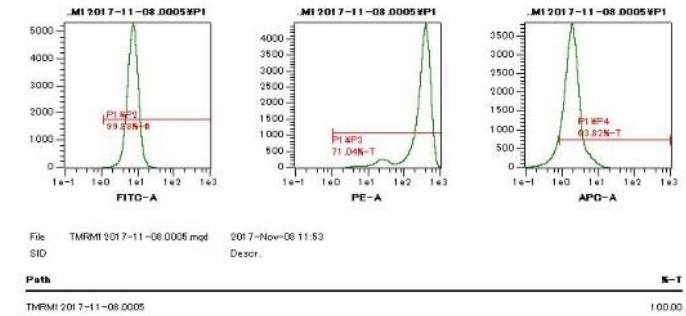
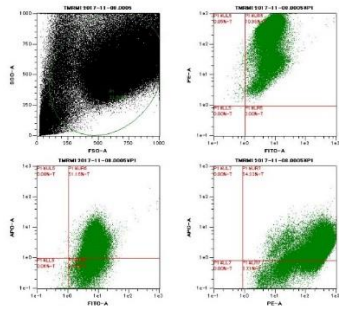


TMRM 1 μ l (1 μ M)

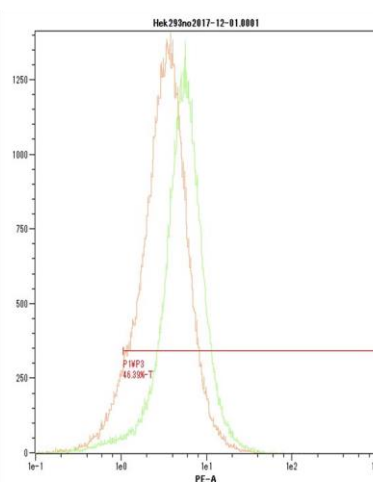
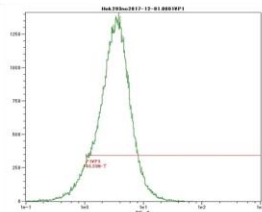
525nm(FITC)

585nm(PE)

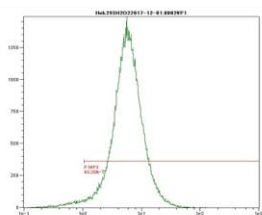
655-730nm(APC)



①MitoSOX™ Redのみ 重ね合わせ(①オレンジ、②緑)



②MitoSOX™ Red + 1mM H₂O₂



検出波長 585nm(PE)

検出波長 585nm(PE)

図5 MitoSOX™ Red による HEK293 細胞のミトコンドリア内の ROS の測定

研究タイトル：③DNA 障害予防効果に関する研究

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 細胞生物学研究室

担当者職名：教授 大坪素秋

1. 研究の目的

テロメア DNA などのヘテロクロマチン領域は様々な外的ストレス因子により障害を受けやすく、さらにそれらによる障害が直接細胞老化促進などの重大な影響を及ぼすと考えられる。ヘテロクロマチン領域がアンチエイジングの標的マーカーとして利用できないか検討を行った。そのために、ヘテロクロマチン領域に対する各種蛍光試薬と蛍光顕微鏡を利用したバイオイメージング法による定性的な評価方法と、フローサイトメーターを活用した定量的な評価方法の両方について確立を目指した。

2. 研究内容

1) テロメア DNA などのヘテロクロマチン領域の可視化【目的④】

その目的で、赤色単量体蛍光タンパク質 mCherry (pmCherry-C1、Clontech 社)にヒト由来のヘテロクロマチンタンパク質の HP1 α を融合させた融合遺伝子発現ベクターpmCherry-HP1 発現プラスミドを作成した。HP1 α はテロメアなどのヘテロクロマチン領域特異的に局在するヘテロクロマチンタンパク質として知られている。

比較的安価な試薬である非脂質性ポリカチオンのポリエチレンジアミンによる方法を用いて、ヘテロクロマチンの観察が容易な NIH3T3 細胞に遺伝子導入を試みた。

その結果、pmCherry-HP1 発現プラスミドを導入した NIH3T3 細胞で赤色単量体蛍光タン

パク質 mCherry の発現を細胞核内に認めた。次に mCherry の発現がヘテロクロマチンと対応しているかをヘテロクロマチン特異的な蛍光試薬であるヘキスト 33342 (青色蛍光) で二重染色することにより確認することができた (図 6)。

mCherry-HP1 (赤色蛍光、G 励起光) ヘキスト 33342(DNA) (青色蛍光、UV 励起光)

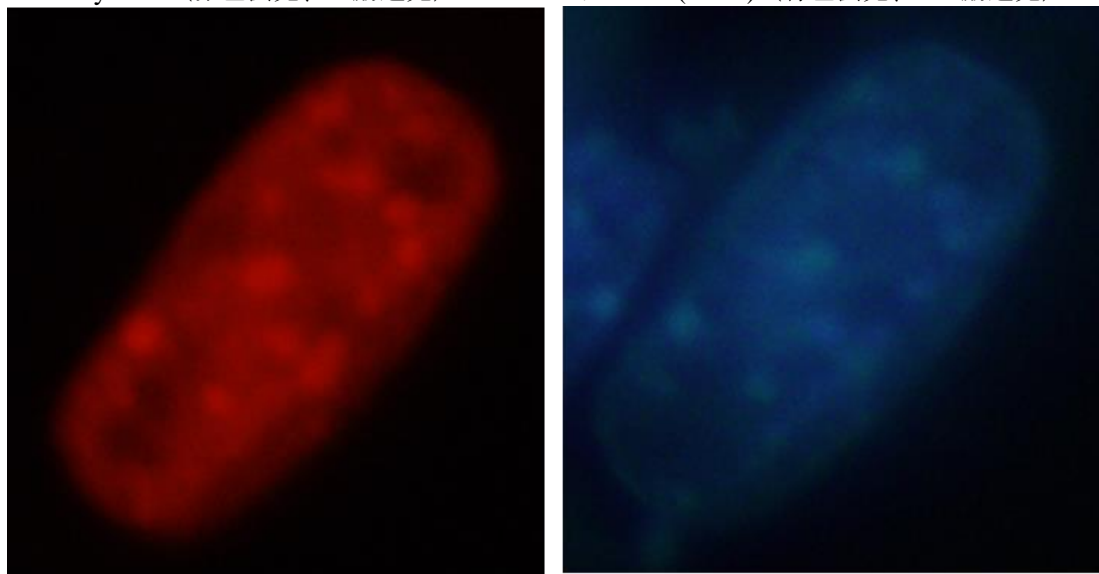


図 6 NIH3T3 細胞核のヘテロクロマチン領域の蛍光顕微鏡による観察。
mCherry-HP1 (左) ヘキスト 33342(DNA) (右) 2,000 倍

2) フローサイトメーターを利用した DNA 障害の検出【目的④】:

増殖中の細胞の DNA になんらかの原因で障害が発生すると、細胞は増殖を停止する。この現象は DNA 障害チェックポイントと呼ばれ、DNA 障害チェックポイントが発動することにより細胞の増殖が中断して DNA の修復が誘導される。DNA 障害の修復が無事に完了すると細胞は再び増殖を開始する。DNA 障害の最大の原因は ROS に代表される酸化ストレスであるので、DNA 障害チェックポイントの誘導をフローサイトメーターにより検出する実験系の確立を目指した。

NIH3T3 細胞に DNA 障害を与えて DNA 障害チェックポイントを誘導させたのち細胞を回収し、DNA 特異的な蛍光試薬のヨウ化プロピジウム (PI) により細胞の DNA を蛍光染色してフローサイトメーターで調べたところ (検出波長 585nm、細胞数 10,000)、DNA 障害チェックポイントが発動した条件下では細胞周期の G₂ 期停止 (G₂ block) がみとめられたことから (図 7)、DNA 障害の検出のための実験系が確立できたと判断した。

以上のごとく、ヒトの培養細胞を用いて DNA 障害予防効果を評価する方法の確立を目指し、1) 蛍光タンパク質を用いて、DNA 障害の指標となる染色体末端のテロメアのヘテロクロマチンの状態を生細胞でモニターできる系と、2) フローサイトメーターを利用した DNA 障害を検出する系を確立することができた。以上の方法を用いて DNA 障害予防効果の有無について、DNA 障害を誘導する各種実験系で実際に調べていくことを今後計画している。

また、DNA 障害予防効果に関する研究の過程で、DNA 複製制御に関する遺伝子のコードするタンパク質のリン酸化とユビキチン化修飾による安定性制御についての研究を共同研究により学術論文に報告することができた (*Mol. Genet. Metab.* 2016)。

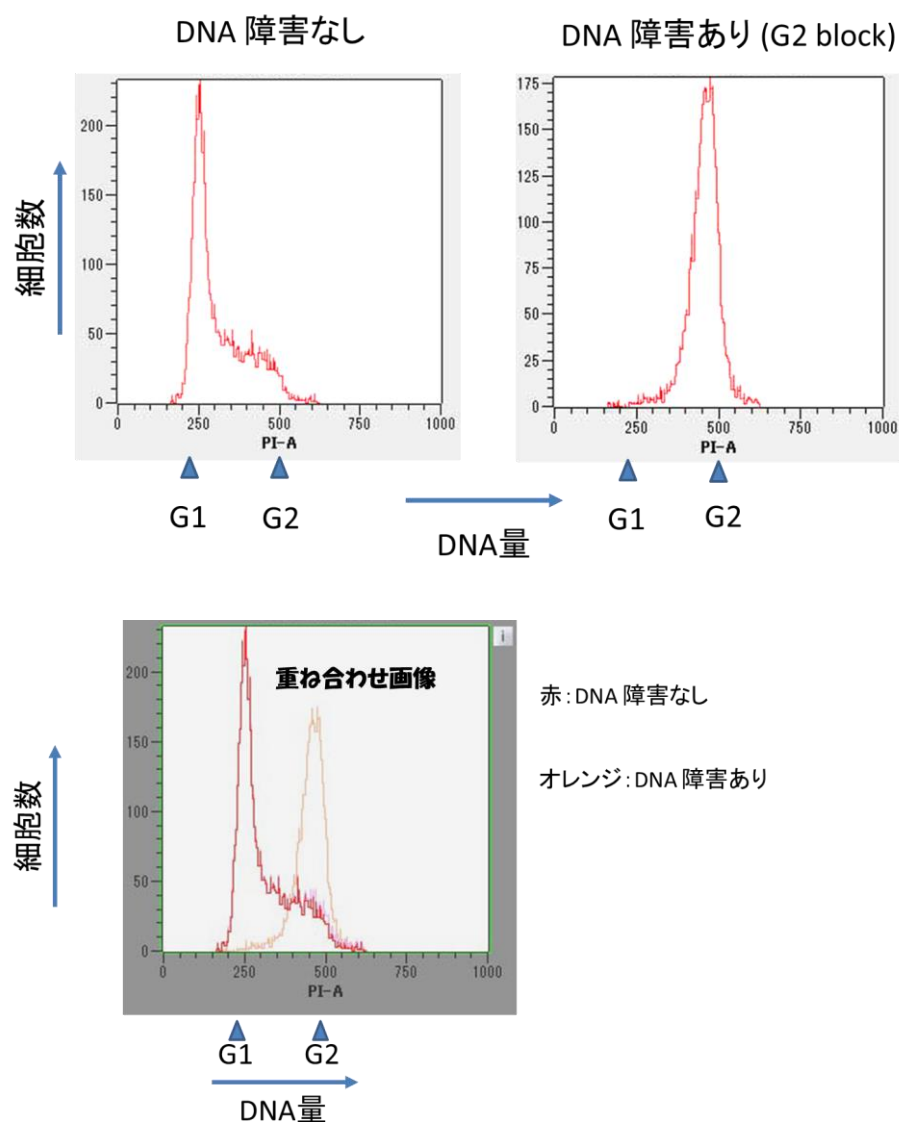


図7. DNA 障害チェックポイントが誘導された NIH3T3 細胞の PI 染色による細胞周期解析 (MACSQuant[®] Analyzer)

3. 研究成果の副次的効果

副次的効果としては、大学内、大学間そして大分県内の企業と連携の共同研究についても本研究成果がきっかけとなって進めることができたので、今後も継続して推し進めていき発展させていきたい。何よりも大きかった副次的効果は、本学の学生と大学院生の教育面での影響であり、本研究課題に関与することで分子生物学と細胞生物学に関しての知識と科

学的思考が養われて、卒業論文と修論のレベルアップにつながった。

今後の計画など

今後は、本研究で確立したミトコンドリアの健康度や DNA 障害予防に関するマーカーを指標にしたアンチエイジング効果を細胞で評価する実験系を活用することで、大分県産の農林水産物やそれらを原料にして本プロジェクトにおいて分離した発酵微生物により製造した発酵醸造食品中にアンチエイジング効果を有する機能性成分が含まれているかを科学的に検証していく。本支援事業に参加している、実験動物やヒトでの研究を実施している他の研究者と密に連絡を取りながら、得られた結果については総合的に評価を行っていきたいと考えている。また、期間内で達成することができなかった免疫力向上を評価する実験系の開発については、今後 HEK293 細胞を用いた培養細胞での炎症性サイトカインのアッセイ系について研究していき開発を目指していききたい。免疫力に関しては、免疫のバランスの重要性が最近明らかになってきているので最新の知識をもとに評価方法について検討していきたい。本研究課題で得られた結果をまとめることにより査読付きの国際雑誌への論文投稿を中心に今後成果の発信を行っていく予定である。

4. 研究成果

a)原著論文

1. *Hara K, Tajima G, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M. Significance of ACADM mutations identified through newborn screening of MCAD deficiency in Japan. *Mol. Genet. Metab.* 118(1): 9-14 (2016).
2. Ohno Y, Suzuki-Takedachi K., Yasunaga S, Kurogi T, Santo M, Masuhiro Y, Hanazawa S, Ohtsubo M, Naka K., Takihara Y. Manipulation of Cell Cycle and Chromatin Configuration by Means of Cell-Penetrating Geminin. *PLoS One.* 11(5):e0155558. doi: 10.1371/journal.pone.0155558. eCollection (2016).
3. Yasunaga S, Ohno Y, Shirasu N, Zhang B, Suzuki-Takedachi K, Ohtsubo M, Takihara Y. Role of Geminin in cell fate determination of hematopoietic stem cells (HSCs). *Int. J. Hematol.* 103(3): 324-329 (2016).
4. *Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugawara K, Ohtsubo M, Nishitani N. . Mutations at multiple CDK-phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of CRL4^{Cdt2} for PCNA and its ubiquitination activity in S phase. *Genes to cells* Feb 9. doi: 10.1111/gtc.12563. [Epub ahead of print] (2018).

b)総説

1. なし

c)招待講演、シンポジウム

1. なし

d)国際学会

1. なし

e) 国内学会

1. Suzuki-Takedachi K, Ohno Y, Kurogi T, Santo M, Yasunaga S, Ohtsubo M, Naka K, Takihara Y. Analysis of molecular role for Geminin in self-renewal and differentiation of HSCs. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2015 年 10 月 18 日 (金沢)
2. Ohno Y, Suzuki-Takedachi K, Kurogi T, Santo M, Yasunaga S, Ohtsubo M, Naka K, Takihara Y. A new strategy for manipulating expression and activity of Geminin, a cell-fate determinant for HSCs. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2015 年 10 月 18 日 (金沢)
3. 竹立 (鈴木) 恭子、大野芳典、黒木利知、安永晋一郎、山藤幹茂子、舛廣善和、花澤重正、大坪素秋、仲一仁、瀧原義宏 DNA 複製とクロマチンリモデリングを制御する Cell-penetrating(CP-) Geminin の開発 日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 2 日(神戸ポートアイランド)
4. 大野芳典、竹立 (鈴木) 恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、安永晋一郎、大坪素秋、仲一仁、瀧原義宏、低線量率被ばくに対する造血幹細胞の分子応答、第 59 回放射線影響学会総会 2016 年 10 月 26 日 (広島)
5. 大野芳典、竹立 (鈴木) 恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、大坪素秋、仲一仁、安永晋一郎、瀧原義宏 造血幹細胞の低線量率放射線被ばくに対する分子応答の解析 日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 2 日(パシフィコ横浜)
6. 大野芳典、竹立 (鈴木) 恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、安永晋一郎、大坪素秋、瀧原義宏 低線量率放射線が造血に与える影響 日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日(神戸ポートアイランド)
7. 竹立 (鈴木) 恭子、大野芳典、山藤幹茂子、白須直人、大坪素秋、安永晋一郎、瀧原義宏 造血幹細胞の細胞周期と分化の制御における Geminin の分子機能 日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日(神戸ポートアイランド)

f)特許

1. なし

g)その他(学会賞、報道など)

1. なし

私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：発酵微生物が産生する抗炎症性機能成分の探索

プロジェクトでの役割：免疫調節作用を有する機能性発酵醸造食品の開発

研究タイトル：①マウス炎症性大腸炎における発酵大麦エキス投与の効果

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 食品機能学研究室

担当者職名：教授 木村靖浩

1. 研究の目的

炎症性大腸炎 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) は、潰瘍性大腸炎や Crohn 病に代表される腸に炎症をきたす疾患の総称である。潰瘍性大腸炎は大腸粘膜を侵し、びらんや潰瘍を形成する原因不明のびまん性炎症性疾患であり、病変は直腸から始まり、連続性に広がると言われている。Crohn 病は若年者に多く見られ、口腔から肛門までの消化管のあらゆるところで炎症が起こるという特徴を示し、小腸及び大腸が好発部位である。潰瘍性大腸炎や Crohn 病に代表される IBD は経過中に寛解と再燃を繰り返し、腸管合併症や腸管外合併症を伴うことがある。また、長期に広範に大腸を侵す場合は、大腸がんの発症リスクが高まる。IBD の典型的な症状は下痢、粘血便、腹痛、発熱などを呈するが、病変範囲と重症度によって左右される。我が国の有病率は欧米と比べて少ないが、近年、増加傾向にあり、難治病情報センターによる平成 26 年度特定疾患医療受給者証所持者数統計では我が国の潰瘍性大腸炎患者数は 166,085 人、Crohn 病患者数は 41,279 人と報告されている。

IBD の病因は未だ完全に解明されていないが、腸管バリア機能の低下、腸内細菌叢の変化により誘発された免疫異常による大腸組織への炎症性免疫細胞の過剰な浸潤が見られる。特に局所における Th1 及び Th17 ヘルパー T 細胞の免疫応答亢進による INF- γ や IL-17A などの炎症性サイトカインの過剰な産生が IBD の粘膜組織傷害への中心的な役割を担うと考えられている。根治療法は依然確立しておらず、治療は炎症を抑える薬物療法と消化管に負担をかけない食事療法で再燃を抑え寛解状態を維持するという対症療法が中心となる。

発酵大麦エキス (Fermented Barley Extract (FBE)、アルコケア®、三和酒類 (株)) の摂取は、腸内環境を改善して腸管免疫機能を調節すること、Lipopolysaccharide 誘導性肝障害の酸化ストレスを軽減し、炎症性サイトカイン産生を抑制して肝機能を保護することなどが動物実験により示されている。FBEは大麦焼酎を製造する過程で副産物として産生される焼酎粕をベースに製造される (図 1)。すなわち、三和酒類 (株) の独自製法によって大麦焼酎粕を分離・精製・濃縮・乾燥させたものであり、その中には麹菌や焼酎酵母が生成した



図 1. 発酵大麦エキスの生産工程 (出典：三和酒類 (株)、2016年健康博覧会資料)

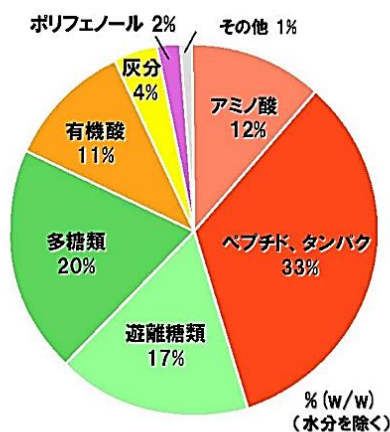


図 2. 発酵大麦エキスの組成 (出典：三和酒類 (株)、2016年健康博覧会資料)

ペプチド・タンパク質を最も多く含み、その他には多糖類・遊離糖類、クエン酸、ポリフェノール類なども含まれる (図 2)。

そこで、本研究では FBE の含有成分による抗炎症作用に着目し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導急性大腸炎 (IBD) マウスにおいて FBE 投与により急性大腸炎緩和作用が認められるかを調べた。

2. 研究内容

1) 実験方法 (動物飼育、糞便性状評価、試料分析)

実験動物は 4 週齢 C57BL/6 雌マウスを使用した。マウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入した。マウスは室温 22±2°C、湿度 50±10% 及び 12 時間の明暗サイクル (明期 7 時~19 時) の飼育環境下にプラスチックケージにて 5 匹ずつの群飼とした。1 週間の環境への順化後、マウスを 2 群に分け個別飼いとし、一方には FBE を 1% 含む AIN93G 精製粉末飼料をまず 20 日間与えた (DSS+FBE 群)。もう一方のマウスには AIN93G 精製粉末飼料を与えた (DSS 群)。その間、飲料水は水道水を自由摂取させた。次

いで各群のマウスには飲料水を水道水から2%DSS溶液に切り替え、7日間与えて急性大腸炎を惹起した。その後、2日間水道水を与えてIBDマウスを安楽死させた(実験29日目)(図3)。また、大腸の長さ及び大腸組織サイトカイン濃度の参考値を得るため大腸炎を起こさせない無処置対照群(Control群)も設けた。DSS

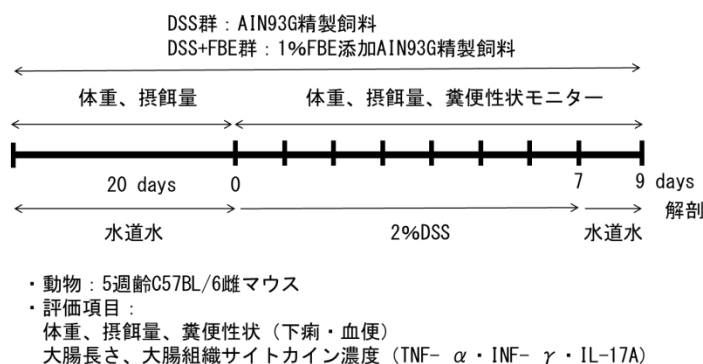


図3. 実験デザイン

投与開始から体重、摂餌量及び糞便性状(下痢・血便の状態)を毎日モニターし、体重減少率及び糞便性状を数値化した。体重減少率スコアは、減少なしあるいは増加が0、1~5%の減少が1、5~10%の減少が2、11~15%の減少が3、15%以上の減少が4とした。下痢のスコアは正常が0、軟便が1、下痢が2、水様性下痢が3とした。血便のスコアは正常が0、部分的血便が1、全体的血便が2、肛門から出血が3とした。さらに体重減少率と糞便性状スコアを平均し、疾患活動指標(Disease Activity Index, DAI)を求めた。実験29日目にマウスをイソフルラン吸入麻酔下に開腹し、下大静脈より採血して脱血死させたのち、直ちに大腸を摘出した。摘出した大腸は、氷冷生理食塩水(大塚製薬(株))にて内容物を洗い出した後、重量と長さを測定し、大腸組織を液体窒素にて迅速凍結し、分析に供するまで-80°Cで凍結保存した。

凍結保存した大腸組織を約30mgを1.5mlマイクロ遠心チューブに秤量した。そこにCell lysis buffer(Santa Cruz Technology, USA)1mlにPhenylmethylsulfonylfluoride(Santa Cruz Technology)を25 μ l及び蒸留水4mlを添加した細胞溶解緩衝液を大腸組織の10倍容となるよう加えた。眼科用小型ハサミで大腸組織を細かく刻んだのち、Homogenizer(S-203, As One)を使って氷水冷下に最低速度で約10秒間、4~5ストロークホモジネートした。そのホモジネートは4°C、10,000 \times gで5分間遠心分離し、その遠心分離上清をBradford法による総タンパク質濃度及びELISA法による炎症性サイトカイン(Tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), Interferon-gamma(INF- γ), Interleukin-17A(IL-17A))濃度の測定に供した。総タンパク質及び炎症性サイトカイン濃度は、それぞれQuick StartTM(Bio-rad laboratories, USA)及びELISAキット(eBioscience, Affymetrix社, USA)を用いて測定した。

2) 結果及び考察

IBDマウスの終体重はDSS群が17.6 \pm 0.5g(Mean \pm SEM)、DSS+FBE群が17.5 \pm 0.4g、実験期間中の累積摂餌量はDSS群が82.3 \pm 8.4g、DSS+FBE群が79.5 \pm 7.4gで、それぞれにFBE投与による影響は認められなかった。

下痢スコア、血便スコア及びDAIの経日変化の結果を、それぞれ図4、図5及び図6に

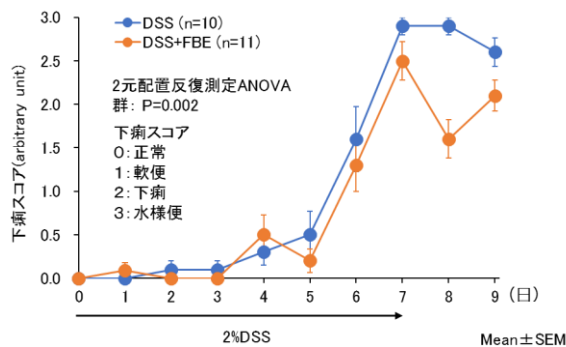


図4. FBEを投与したIBDマウスの下痢スコアの経日変化

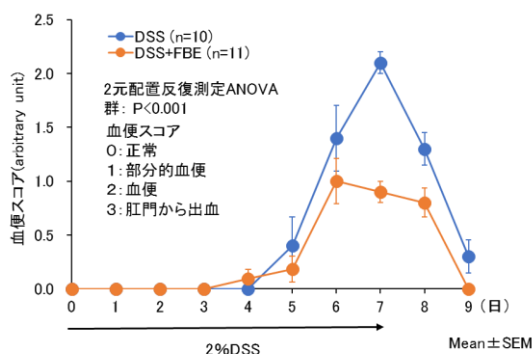


図5. FBEを投与したIBDマウス血便スコアの経日変化

示した。DSS+FBE 群の下痢スコアは、DSS 群に比べ低値で推移し、FBE 投与により有意に IBD マウスの下痢症状が改善された ($p=0.002$) (図 4)。血便スコアの経日変化も下痢スコアの経日変化同様に、DSS+FBE 群が DSS 群に比べ低値で推移し、FBE 投与により有意に IBD マウスの血便症状が改善された

($p<0.001$) (図 5)。さらに体重減少率、

下痢及び血便スコアから算出した DAI の経日変化は、DSS+FBE 群が DSS 群に比べ低値で推移し、FBE の投与により DAI にも有意な改善が認められた ($p<0.001$) (図 6)。

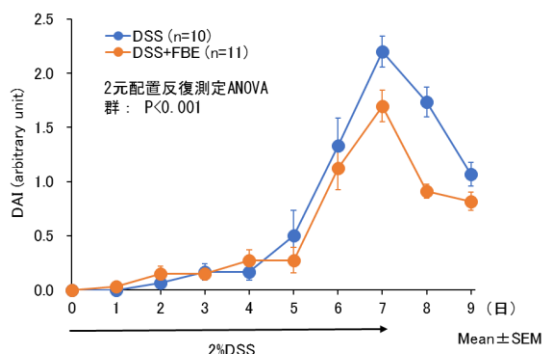


図6. FBEを投与したIBDマウスDAIの経日変化

IBD マウスの大腸の長さは、FBE を投与したマウス (DSS+FBE 群) の大腸の長さが 6.2 ± 0.1 cm で DSS 群マウスの 5.5 ± 0.12 cm に比べ有意に長かった ($p<0.05$)。しかし、正常マウス (Control 群) の大腸の長さ 6.8 ± 0.4 cm と比べて差はなかった。

IBD マウスの大腸組織炎症性サイトカイン濃度の結果を、それぞれ図 7、図 8 及び図 9 に示した。DSS 群マウスの大腸組織 TNF- α 濃度は、Control 群マウスに比べ約 6 倍高くなった ($p<0.05$)。しかし、FBE 投与によりその上昇が約 3.7 倍までに抑制された (図 7)。大腸組織 INF- γ 濃度は、Control 群に比べ、DSS 群及び DSS+FBE 群共に、有意に高値を示し ($p<0.05$)、FBE 投与による影響は認められなかった (図 8)。INF- γ 濃度の結果と同様、IL-17A 濃度も Control 群に比べ、DSS 群及び DSS+FBE 群共に有意に高値を示し ($p<0.05$)、FBE 投与による影響は認められなかった (図 9)。

以上のように FBE 投与により IBD マウスの主要臨床症状 (下痢・血便の程度) が軽減されること、FBE の投与は、通常、DSS で誘導した IBD マウスで短縮する大腸の長さを維持し、さらに FBE は大腸組織 TNF- α レベルを低下させることがわかった。大腸組織 INF- γ 及び IL-17A 濃度には FBE 投与の影響が見られなかったが、TNF- α 濃度を低下させたことにより、FBE は大腸組織へ浸潤した Th1 ヘルパー T 細胞よりもマクロファージの活性化を抑制して、大腸炎を緩和する可能性が示唆された。

FBE は、原料、麹菌、焼酎酵母に由来するアミノ酸、ペプチド、タンパク質、オリゴ糖、難消化性多糖類、有機酸、ビタミン、ミネラルなど数々の有用な成分を含む。特に FBE に含まれるオリゴ糖及び β -グルカンなどの難消化性糖類は腸内の乳酸菌及びビフィズス菌の増殖を促し、酢酸、酪酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸の産生を増すことで腸内環境を改善して腸管免疫機能を調節すること、また、マウス腹腔内マクロファージを活性化することがわかっている。本研究においても FBE に含有されるそれら難消化性オリゴ糖及び多糖類による腸内環境の変化を介して大腸炎の症状が軽減されたと推測される。

筆者は、FBE が前述のように難消化性オリゴ糖・多糖類及び抗酸化性ポリフェノール類を比較的多く含むことから、それらの成分が腸内環境の改善や腸管バリア機能を保持すること、さらに大腸に浸潤した免疫細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制して大腸炎の症状軽減に寄与しているのではないかと推測している。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画

1) 副次的効果

本研究により見出された発酵大麦エキスに大腸炎軽減作用があるという知見は、作用メカニズムが明らかになるという前提ではあるが、他の炎症に起因する炎症性疾患、例えば非アルコール性肝障害、軽度炎症が全身的に広がっていると言われている肥満、糸球体腎炎を主徴とする慢性腎臓病 (CKD) などに応用が可能かと思われる。機会があればそれら疾患モデル動物で発酵大麦エキスの有用性を検討したいと考えている。

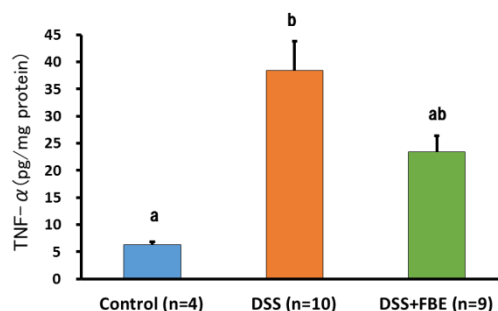


図7. FBEを投与したIBDマウスの大腸組織TNF- α 濃度数値はMean \pm SEMで示した。異なるアルファベットの平均値はクラスカル・ウォリスの一元配置分散分析により $p<0.05$ で有意差あり。

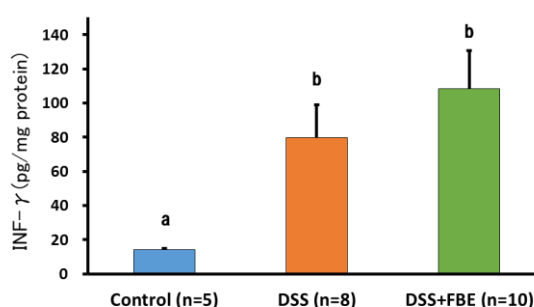


図8. FBEを投与したIBDマウスの大腸組織INF- γ 濃度数値はMean \pm SEMで示した。異なるアルファベットの平均値はクラスカル・ウォリスの一元配置分散分析により $p<0.05$ で有意差あり。

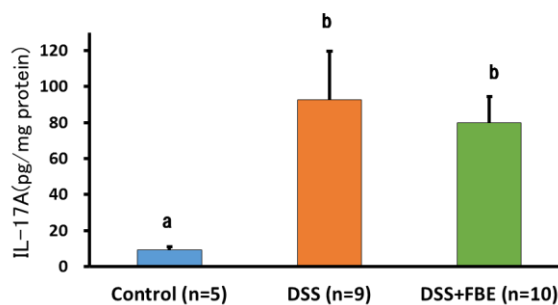


図9. FBEを投与したIBDマウスの大腸組織IL-17A濃度数値はMean \pm SEMで示した。異なるアルファベットの平均値はクラスカル・ウォリスの一元配置分散分析により $p<0.05$ で有意差あり。

2) 今後の計画

将来的には IBD を緩和・予防する機能性発酵食品の開発を目指しているが、現段階ではマウスの急性大腸炎モデルにおいて下痢及び血便の程度など臨床症状の緩和に発酵大麦エキス投与が有効である可能性が示唆された知見を得たのみでそれらの作用機序を明らかにできていない。ヒトへ応用するためにはまだまだ道のは遠く、安全性の確認、有効投与量の設定やさらに作用メカニズムに関するデータの蓄積が必要となる。麹菌及び酵母などにより調製した発酵食品に抗炎症作用があることを解明し、ヒト IBD 患者に応用できれば、炎症の寛解と再燃を繰り返す IBD 患者の寛解期の延長、増悪化の防止・軽減など、患者の QOL 改善につなげることができると考えられる。次のステップとして発酵大麦エキスの抗炎症作用を確認するため本研究で使った急性期ではなく炎症の程度がよりマイルドな慢性期の大腸炎マウスで発酵大麦エキスの効果を評価したい。その上で抗炎症作用の機序を探索するため大腸組織に浸潤した免疫細胞を分取してそれら免疫細胞のマーカーサイトカインの mRNA を検出する実験系を確立して抗炎症作用の作用メカニズムを検討したい。

研究タイトル：②マウス炎症性大腸炎における甘酒投与の効果

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 食品機能学研究室

担当者職名：教授 木村靖浩

1. 研究の目的

炎症性腸疾患 (IBD) の病因は未だ解明されていないが、遺伝子的な素因によって通常の大腸内細菌に対して異常な免疫応答を示すことが病態の発症に関与していると推測されている。腸内細菌叢の変化により誘発された免疫異常による大腸組織への炎症性免疫細胞の過剰な浸潤が見られ、特に出血性の壊死を生じさせる TNF- α 、免疫細胞の産生を促進させる IL-1 β 、炎症部位へ免疫細胞の遊走を促す IL-17A の過剰な産生と免疫抑制作用のある IL-10 の産生低下が粘膜組織傷害の主な原因と考えられている。

従来、当研究室では食品に含まれる抗炎症作用を有する機能性成分 (生理活性物質) の探索をしており、現在は IBD に焦点を当て、その発症予防や症状を軽減する食品及び食品機能性成分の探索を行っている。

清酒、みそ、醤油などの製造に使われる麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のような発酵微生物は、有機酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、難消化性オリゴ糖・多糖類及び核酸関連物質など生体調節に関与する様々な機能性成分を産生することが知られており、発酵微生物が産生する生理活性物質の機能性食品素材としての応用が期待されている。実際に米麹により調製した甘酒には、麹菌が産生する炎症時に減少すると言われているビタミン B 群、グルコース、難消化性オリゴ糖及び多糖類、アミノ酸、ペプチド及びタンパク質、有機酸類を豊富に含んでいることが知られている。麹菌発酵穀物胚芽の投与は潰瘍性大腸炎ラットの腸内細菌叢を改善して腸管免疫機能を調節し大腸炎症状を緩和すること、また、

DSS 誘導性潰瘍性大腸炎マウスにおいても麹菌発酵穀物胚芽の投与が大腸炎の症状を緩和し、大腸組織の炎症性サイトカイン産生を抑制することが報告されている。

そこで、本研究では米麴により調製した甘酒投与により期待される腸内環境改善作用及び抗炎症作用に着目し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導急性大腸炎 (IBD) マウスにおいて甘酒投与による大腸炎緩和作用が認められるかを調べた。

2. 研究内容

1) 実験方法 (被検物調製、動物飼育、糞便性状評価、試料分析、大腸病理組織学検査)

甘酒には清酒の製造過程でできる酒粕を使った酒粕甘酒と米麴を使った麴甘酒があるが、今回は自作した麴甘酒を使用した。その調製工程を図 1 に示した。もち米 1.5 合に水 420 ml を加えて炊飯した。炊き上がったもち米を保温調理鍋に移して 200 ml の熱湯を加え、よく攪拌して 70℃ まで冷却した。そこに乾燥米麴 (株ますやみそ、広島県呉市) 250 g を加え、よく混合し 6 時間保温した (40℃ 程度になる)。鍋を弱火にかけ内容物の温度が 60~62℃ になるよう加温し、60℃ でさらに 5 時間保温した。

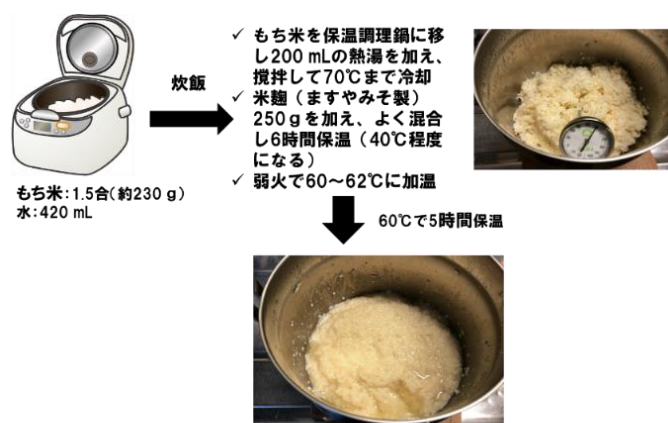


図 1. 甘酒の調製方法

甘酒の一般成分分析には以下の方法を用いた。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質は改良ケルダール法、脂質はソックスレー脂質抽出法、灰分は直接灰化法により測定した。炭水化物は差し引き法により算出した。

実験動物は 4 週齢 C57BL/6 雌マウスを使用した。マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスは室温 22℃±2℃、湿度 50%±10%及び 12 時間の明暗サイクル (明期 7 時~19 時) の飼育環境下でプラスチックケージにて 5 匹の群飼とした。1 週間環境に順化させた後、マウスを 2 群に分け個別飼いと、一方のマウス (DSS 群) には AIN93G 精製固形飼料のみを、他方のマウス (DSS+AMZ 群) には AIN93G 精製固形飼料に加えマウスの腸内環境を整えるため甘酒を 1 日当たり 0.5 g、21 日間与えた。その間、飲料水は水道水を自由摂取させた。次いで各群のマウスの飲料水を水道水から 2% DSS 溶液に切り替え、7 日間与えて急性大腸炎を惹起した。さらにその後 3 日間、大腸の炎症状態を維持するため 1% DSS 溶液を継続投与した (図 2)。また、大腸の形態 (長さ及び重量) 及び大腸組織炎症関連サイトカイン濃度の参考値を得るため大腸炎を起こさせない無処置対照群 (Control 群) も設けた。DSS 投与開始後からの体重、糞便性状 (下痢・血便の状態) のモニター及びそれらを基にした DAI のスコア化は①の研究と同様に行った。

実験 31 日目に各群のマウスをイソフルラン吸入麻酔下に開腹し、下大静脈より採血して脱血死させ、直ちに大腸を摘出した。摘出した大腸は氷冷生理食塩水（大塚製薬（株））にて内容物を洗い出した後、長さ重量を測定し、残りの大腸組織を液体窒素にて迅速凍結し、分析に供するまで -80°C で凍結保存した。また、凍結保存とは別に病理組織学的検査を行うために DSS 群、DSS+AMZ 群及び Control 群のマウス、それぞれ 4 匹、4 匹及び 2 匹の大腸組織を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて浸漬固定し、検査に提供した。

凍結した大腸組織は①の研究で示した方法と同様に処理をして、総タンパク質濃度を Bradford 法により、炎症関連サイトカイン濃度 (TNF- α 、IL-17A、IL-1 β 及び IL-10) を ELISA 法により測定した。

マウス大腸組織切片の作製及び一般病理組織学的検査は、株式会社バイオ病理研究所（大分県国東市）に依頼した。DSS 群、DSS+AMZ 群及び Control 群のマウス、それぞれ 4 匹、4 匹及び 2 匹の浸漬固定した大腸組織を横断面にて輪切りした。輪切した組織をパラフィン包埋したのち、 $3\mu\text{m}$ の厚さで薄切を行った。薄切切片はヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) を施した。なお、病理組織学的検査はサンプルの詳細を知らされていない上記研究所の研究者により行われた。

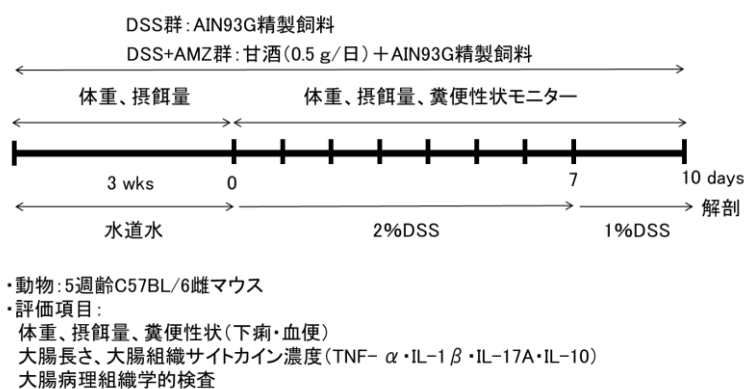


図2. 実験デザイン

2) 結果及び考察

甘酒の一般成分分析結果を図 3 に示した。本研究で使用した甘酒の一般成分の分析結果は、水分が 51%、たんぱく質が 3%、脂質が 0.03%、炭水化物が 45%及び灰分が 1%であった。

実験期間中の累積摂餌量は DSS 群が 70.7 ± 1.4 g、DSS+AMZ 群が 66.7 ± 1.7 g で、累積熱量摂取量は DSS 群が

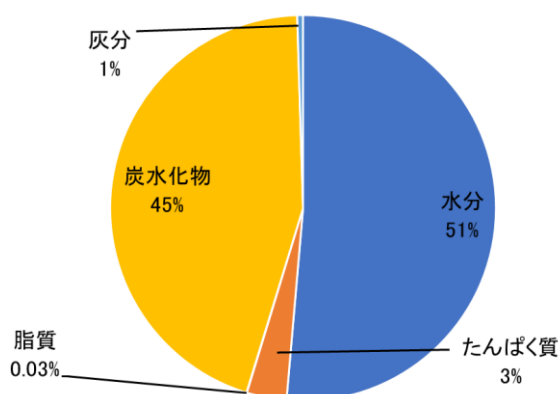


図3. 甘酒の一般成分

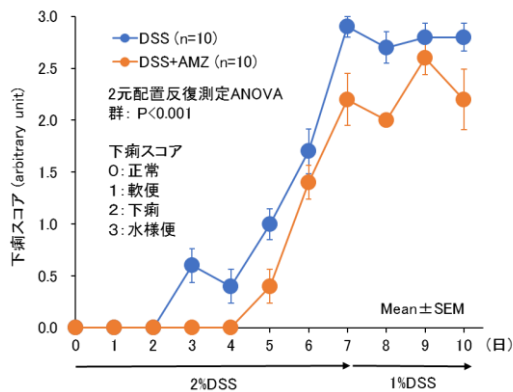


図4. 甘酒を投与したIBDマウスの下痢スコアの経日変化

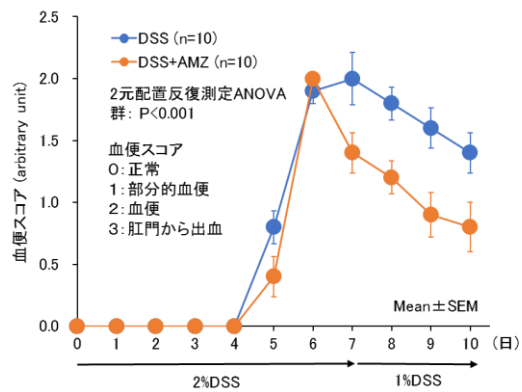


図5. 甘酒を投与したIBDマウス血便スコアの経日変化

283.0±5.6 kcal、DSS+AMZ 群が 297±6.9 kcal で、それぞれ群間に差は見られなかった。甘酒の熱量は、一般成分分析 (図3) で求めたたんぱく質、脂質、炭水化物量を基に各々のアトウォーター係数を乗じて算出した (0.96 kcal/甘酒 0.5 g)。IBD マウスの終体重は DSS 群が 17.6±0.4 g、DSS+AMZ 群が 19.1±0.3 g であり、終体重は甘酒投与により有意に重かった (p<0.05)。

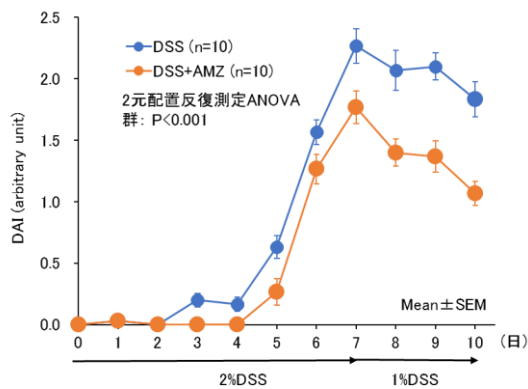


図6. 甘酒を投与したIBDマウスDAIの経日変化

IBD マウスの下痢スコア、血便スコア及び DAI の経日変化を、それぞれ図4、図5及び図6に示した。IBD マウス下痢スコアは、DSS+AMZ 群が DSS 群に比べ低値で推移し、甘酒投与により有意に下痢の症状が改善された (p<0.001) (図4)。血便スコアの経日変化も下痢スコアの結果と同様に、DSS 群に比べ DSS+AMZ 群において低値で推移し、甘酒投与により有意に血便の症状が改善された (p<0.001) (図5)。また、DAI も DSS+AMZ 群が DSS 群に比べ低値で推移し、甘酒投与により DAI の有意な改善が認められた (p<0.001) (図6)。

IBD マウスの大腸重量に甘酒投与の影響は認められなかった。一方、IBD の発症によりマウスの大腸の短縮が認められた (Control 群 vs. DSS 群、p<0.05)。しかしながら、DSS+AMZ 群マウスの大腸の長さは DSS 群に比べ有意に長かった (DSS 群: 4.75±0.17 cm vs. DSS+AMZ 群: 5.90±0.23 cm、p<0.05) が、Control 群 (7.14±0.17 cm) との間には有意差は認められなかった (図7)。

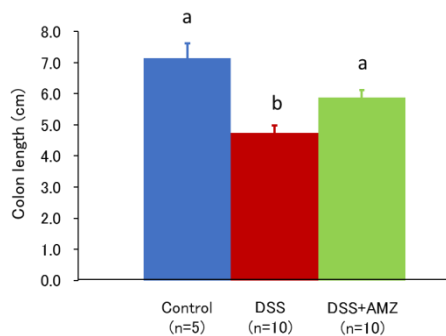


図7. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸の長さ
 数値はMean±SEMで示した。異なるアルファベットの平均値は

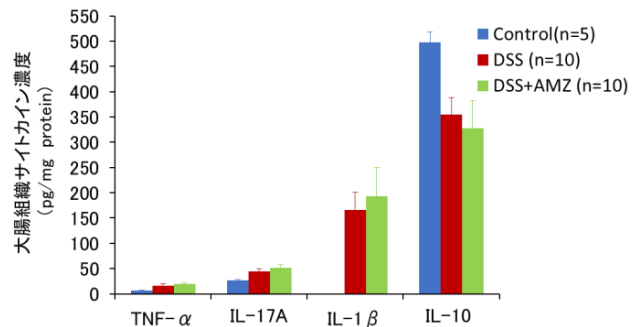


図8. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸組織サイトカイン濃度
 クラスカル・ウォリスの一元配置分散分析によりp<0.05で有意差あり。数値はMean±SEMで示した。

ELISA 法により測定した大腸組織炎症関連サイトカイン濃度の結果を図 8 に示した。

IBD マウスの大腸組織 TNF-α 濃度及び IL-17A 濃度は、Control 群と比較して、それぞれ約 3 倍及び約 2 倍高くなった。しかし、DSS 群と DSS+AMZ 群の TNF-α 濃度及び IL-17 A 濃度を比較すると両群間に差は見られず、甘酒投与による影響は認められなかった。また、Control 群マウスの大腸組織 IL-1β 濃度は検出限界以下であったが、DSS 群と DSS+AMZ 群の IL-1β 濃度を比較すると両群間に差は見られず、甘酒投与による影響は認められなかった。一方、抗炎症性のサイトカイン IL-10 濃度は、IBD マウスにおいて Control 群に比べて約 2/3 程度に低下した。しかし、DSS 群及び DSS+AMZ 群では両群間に差は見られず、甘酒投与による影響は見られなかった。

次に IBD マウスの大腸病理組織学的検査の代表的な結果を図 9 に示した。大腸病理組織学的検査において IBD 発症により粘膜細胞の脱落の程度は DSS 群及び DSS+AMZ 群の両群間に大きな違いは認められなかった。しかし、DSS 群マウスでは炎症性細胞の浸潤が筋層にまで及び、内輪筋の断裂 (←) が

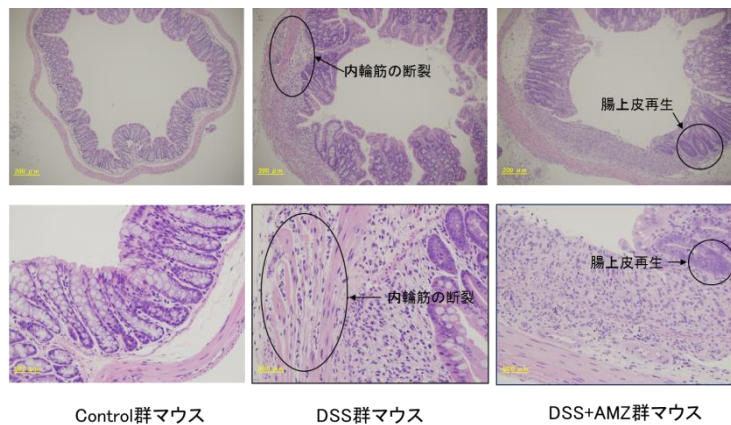


図9. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸病理組織像 (HE染色、上段:100倍像、下段:400倍像)

図9. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸病理組織像

3/4 例で認められたのに対し、DSS+AMZ 群マウスでは 0/4 例であった。さらに甘酒を投与したマウスにおいて腸上皮再生の亢進 (→) が 3/4 例で認められたのに対し、DSS 群マウスでは 1/4 例であった。

本研究の目的は、甘酒の投与により DSS 誘導性 IBD マウスの大腸炎緩和作用が認められるかを調べることであった。

通常、DSS により惹起した IBD マウスで短縮する大腸の長さは甘酒の投与によってその程度が抑制された。さらに IBD の主な臨床症状である下痢及び血便の程度が軽減され、

DAIも改善された。また、IBDマウスの大腸病理組織像では、甘酒投与マウスでは筋層への炎症性細胞の浸潤がDSS群マウスに比べて軽度で、内輪筋の断裂が認められなかった。しかしながら、大腸組織の炎症関連サイトカイン濃度には甘酒投与の影響は認められなかった。

甘酒には、炊飯米に米麴と酒粕を混合して作製する酒粕甘酒と炊飯米に米麴のみを使って作製する麴甘酒がある。元来、甘酒と言えば麴甘酒を指していたようであるが、近年では酒粕甘酒が一般的に普及しているようである。それに並行して酒粕甘酒の機能性の評価が行われるようになってきた。マウスを使った動物実験で酒粕甘酒の肥満抑制効果や血圧上昇抑制効果が示されている。抗肥満作用については、高脂肪食負荷マウスにおいて甘酒に含まれる酒粕由来の食物繊維が便中への胆汁酸、コレステロール及び脂質の排泄量を増加させ、そのため、体重、血清中性脂肪及び総コレステロール濃度、脂肪組織の増加が抑制されることにより、抗肥満効果がもたらされたと考えられている。また、血圧上昇抑制の要因としては酒粕由来のACE阻害ペプチドの関与が示唆されている。その他にも甘酒に含まれるコウジ酸にはメラニン色素生成を抑制する効果や、エルゴチオネインには強い抗酸化作用によるフリーラジカル消去活性も確認されている。一方、米麴を原料とする甘酒にも麴菌が産生する様々な機能性成分が含まれている。麴甘酒の作製には麴菌を蒸米に接種して調製した米麴を使用する。蒸米に麴菌を作用させると麴菌が有する酵素（プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼなど）の作用によってそれまで蒸米にはなかった成分が約400種も蓄積されると言われている。それらには必須アミノ酸、複合タンパク質、グルコース、オリゴ糖、難消化性多糖類、有機酸類、ビタミン類など生理活性をもった物質が含まれている。このように甘酒はヒトに必要な栄養素を数多く含んでいることから「飲む点滴」とも言われ、疲労回復や夏バテ予防などに古来より重宝されている。さらに近年では女性の健康や美容への関心も高く、甘酒消費が拡大していると言われている。麴甘酒の代表的な機能性成分にオリゴ糖や難消化性多糖類が挙げられ、それらには腸内のビフィズス菌や乳酸菌を増やす働きがあることから腸内細菌叢の改善を介した整腸作用が期待される。

酒粕甘酒は麴菌の作用に加えて清酒酵母の作用による様々な機能性成分が相加的に含まれることから麴甘酒に比べ有用性は高いかもしれない。しかし、酒粕を使用しているため程度の大小はあると思われるが、アルコール成分の混入は避けがたいと思われる。我々は消化管粘膜に炎症が起こるIBDに焦点を当て、その症状を軽減する食品及び食品機能性成分を探索する研究をしているため被験物へのアルコール成分の混入は極力避けたいと考え、本研究では麴甘酒を使用した。マウス及びラット急性大腸炎モデルにおいて麴菌発酵穀物胚芽の有用性が報告されているものの、前述のように甘酒には様々な炎症に有効な機能性成分が含まれていることが示唆されているにも関わらず、甘酒を炎症性腸疾患に応用した報告は未だ見当たらない。今回の研究結果は、下痢、血便などのIBDマウスの主要な臨床症状が麴甘酒投与によって有意に軽減されることがわかったが、大腸組織の炎症関連

サイトカイン濃度には甘酒投与による明らかな影響が認められなかった。その理由としては、①薬剤に比べて食品や食品成分による介入ではその効果が緩やかでこのような炎症が激しい急性期大腸炎モデルではその効果をうまく検出できなかった、②さらに炎症関連サイトカイン濃度はマウスによって個体差が大きかった点、③また、炎症関連サイトカイン濃度の測定に試料として使った大腸の部位が統一できなかった点が結果に影響しているものと考えている。一方、IBD マウスの大腸病理組織像においては、無処置の IBD マウスでは、大腸粘膜下組織への炎症性細胞の浸潤が著しく、内輪筋の断裂が認められた。しかし、甘酒を投与したマウスでは、粘膜細胞の脱落範囲が大きい個体があったものの、総じて粘膜下組織及び筋層への炎症性細胞の浸潤が無処置 IBD マウスに比べて少なく、内輪筋の断裂は検査したマウスで 1 例も認められなかった。さらに甘酒投与により腸上皮再生の亢進が認められたことから、甘酒は粘膜傷害を防御する作用を有する可能性が示唆された。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画

1) 副次的効果

①の研究と同様、本研究により見出された甘酒に大腸炎軽減作用があるという知見は、作用メカニズムが明らかになった上での前提ではあるが、他の炎症に起因する炎症性疾患、例えば非アルコール性肝障害、軽度炎症が全身的に広がっていると言われている肥満症、糸球体腎炎を主徴とする慢性腎臓病 (CKD) などに応用が可能かと思われる。機会があればそれら疾患モデル動物で甘酒の有用性を検討したいと考えている。

2) 今後の計画

本研究において古来より日本において飲用されてきた甘酒に炎症性大腸炎を抑える可能性が示唆されたことはたいへん興味深い。これまで日常的に飲用されており、経験的に安全性も確立されている食品が、寛解と再燃を繰り返す炎症性腸疾患患者の QOL (寛解期の延長、増悪期の軽減・増悪期の短縮など) の改善の一助として臨床応用ができれば、その意義は大きいと思われる。

本研究において甘酒が急性大腸炎マウスの主要臨床症状 (下痢、血便、体重減少の程度) を軽減すること、大腸炎マウスで起こる大腸の短縮を抑制することが認められた。さらに大腸病理組織学的検査結果でも甘酒を投与したマウスにおいて粘膜障害を軽減する所見が得られた。しかしながら、これらの結果と大腸組織炎症関連サイトカイン濃度の結果に一致が認められなかった。

今後は、今回の結果を踏まえて炎症症状が激しい急性大腸炎モデルではなく炎症症状が緩徐な慢性大腸炎モデルに変更し甘酒の効果を検討したい。また、大腸の炎症を抑える最適な甘酒投与量を検討する必要もある。さらに摂餌量及び摂取熱量への影響も考え無処置 IBD マウスには被検物に代わる粥など甘酒に類似する対照物を与えるなど実験系を改善し、炎症性大腸炎における甘酒の抗炎症作用を調べたいと考えている。さらに①の研究と同様に

大腸組織に浸潤したヘルパーT リンパ球やマクロファージなど免疫細胞を分離し、それら免疫細胞特有の炎症に関連するサイトカイン mRNA の発現を測定する実験系を確立して粘膜傷害の程度との関連やタイトジャンクション関連タンパク質を検出して腸管バリア機能も評価し、甘酒による大腸炎軽減作用の作用メカニズムを探索していきたいと考えている。

4. 研究成果

a)原著論文

なし

b)総説

なし

c)招待講演、シンポジウム

なし

d)国際学会

なし

e) 国内学会

1. 2015年 日本栄養改善学会九州・沖縄支部学術総会 1件
2. 2015年 九州栄養学研究会 1件

f)特許

なし

g)その他(学会賞、報道など)

なし

私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：大分県産発酵食品製造過程における低アレルギー化に関する基礎的研究

プロジェクトでの役割：食品中のアレルギータンパク質の解析

研究タイトル：①柑橘類のアレルギーに関する研究

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 食品加工学研究室

担当者職名：教授 高松伸枝

研究協力者：近藤康人、松田幹、柘植郁哉、林毅、宇理須厚雄、田中裕、栗原和幸

1. 研究の目的

柑橘類はバナナについて国内外で広く生産、消費される果物であり、大分県は温州みかんやかぼすなどのこれら柑橘類の特産地である。一方、近年食物アレルギーは増加傾向にあり、社会問題化されている。柑橘類の一種であるオレンジは、食品表示法のアレルギー推奨表示品目のひとつとなっているものの、そのアレルギータンパク質の研究は本邦で十分になさ



れていない。そこで、柑橘類のアレルギーの臨床像及びアレルギータンパク質の解析とともに柑橘類や柑橘類加工品のアレルギー性、安全提供のための低アレルギー化について検討し、将来的な発酵利用による低アレルギー化のための基礎データ蓄積を目的とした。

温州みかんはミカン属（柑橘属）ミカン類に属しており、オレンジ類などと多くの交配種が生産されその種類は多い（表 1）。

表 1 オレンジの分類

一方、果物アレルギーの先行研究で明らかになっている。アレルギーのタイプは、果物そのものによって感作（経皮・経腸管）されて発症するタイプ（即時型症状）、特殊型として

果物を摂取後の運動によりアナフィラキシーを誘発するタイプ (FDEIA:食物依存性運動誘発アナフィラキシー)、また花粉による経気道感作ののちに、花粉アレルゲンとの交差反応

オレンジ (<i>Citrus sinensis</i>)のアレルゲン	
Cit s 1	GLP (Germin-like proteins 23~24kDa) 耐熱性 諸外国ではメインアレルゲン
Cit s 2	Profilin (Actin-Binding Proteins 13~14kDa) 容易に変性 花粉と交差反応を指摘
Cit s 3	LTP (Lipid Transfer Proteins 9kDa) 耐熱性 諸外国ではAn原因タンパク

によって発症し、症状は口腔内に限局されるタイプ (OAS、PFAS : 口腔アレルギー症候群、花粉果物アレルギー候群) にわかれている。これらの症状をひきおこす既知の柑橘類 (オレンジ) のアレルゲンは、下記の3つのタンパクが知られているが、そのほとんどが海外での症例に限られている (表 2)。

表 2 既知のオレンジアレルゲン

2. 研究内容

本研究は、日本の柑橘類アレルギーの臨床像、重症柑橘類アレルギーの症例を明らかにするとともに、柑橘類間及び花粉との共通抗原性、及びアレルゲンの特定後、加工食品を低アレルゲン化することが可能であるかについて検討を行った。患者血清の集積にあたっては、一般的に食物アレルギーの発症は乳幼児期がピークであるため、大分大学医学部、藤田保健衛生大学及び神奈川こども小児医療センター、あいち保健医療総合センター等の協力を得た。患者対象は、医療機関を受診して柑橘類摂取による明らかな既往があり、オレンジに対する特異的 IgE 抗体価が陽性の患者 12 名とした。施行可能な患者には、皮膚試験、食物経口負荷試験、舌下試験、運動誘発試験を行った。本研究の protocol は藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理審査委員会の審査を経て、全患者に書面による informed consent を得た。

患者の柑橘類の特異的IgE抗体価及び皮膚試験結果							
No.	Group	Age Sex	ImmunoCAP® (UA/ml)			SPT	
			Orange	Grapefruit	Valencia orange (<i>Citrus sinensis</i>)	Mikan (<i>Citrus unshiu</i>)	Grapefruit (<i>Citrus × paradisi</i>)
1		6 M	3.22	4.65	2+	1+	2+
2		11 F	3.74	10.6	2+	NT	NT
3		12 F	7.3	24.5	2+	3+	2+
4	OAS	14 F	1.21	8.86	2+	2+	-
5		16 F	0.83	1.86	-	-	-
6		9 F	0.7	1.53	2+	2+	2+
7		11 F	2.59	9.72	2+	2+	2+
8		11 F	2.79	3.59	2+	2+	2+
9		10 F	0.85	<0.35	2+	3+	3+
10	FDEIA	11 M	1.07	0.92	NT	NT	NT
11		22 F	3.25	1.11	NT	NT	NT
12		15 F	2.51	2.09	2+	2+	2+

柑橘 2 種の抗体価間で相関 ($r=0.83$) がみられた。
皮膚試験においても、柑橘 3 種間で同様の結果がみられた。

表 3 柑橘類アレルギー患者 検査結果

小児科での患者集積を中心に行った結果、発症年齢は 10 歳前後で、花粉症の発症とともに症状を誘発するケースが主にみられた。症例は、患者問診では、オレンジ類 (パレンシア・ネーブル) の摂取による症状誘発エピソードが最も多かったが、ほとんどの患者は、温州みかんを含む柑橘類全般に対して症状を訴えていた (表 3)。

症状は口腔周囲 (OAS 群)、あるいは食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA 群) に分かれ、オレンジ特

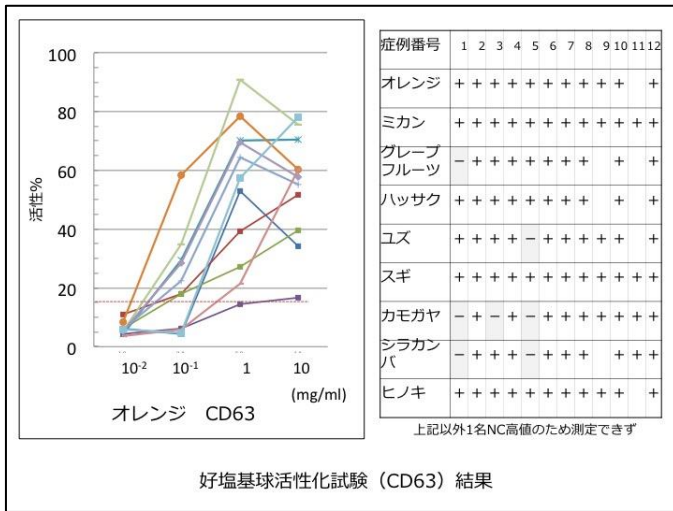


図1 柑橘類アレルギー患者血液による好塩基球活性化試験

ができない場合があり、診断に苦慮することがあるが、今回の結果から、FDEIA 群、OAS 群いずれも生体内で IgE-mediated な反応が生じていることが確認でき、本試験によって柑橘類アレルギーの確定診断に役立つものと思われた。

次に症状分類 2 タイプの患者の花粉感作状況について検討した (図 2)。柑橘類アレルギー患者のほぼ全員の患者がスギ

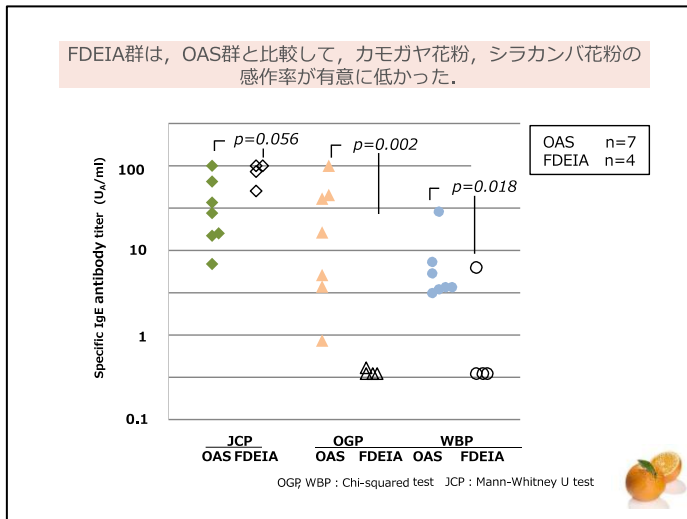


図2 柑橘類アレルギー患者の花粉 (スギ: JCP、カモガヤ: OGP、シラカンバ: WBP) 特異的 IgE 抗体価の症状分類における比較

の予後において、これら花粉特異的 IgE 抗体価を測定することによって、重症度の判定ができる可能性が示唆された。

異的 IgE 抗体価は 0.7~3.74、皮膚試験 (スキンプリックテスト) では、検査を行なった全員が 2+ の陽性であった。さらに生体内での反応を検討するために、好塩基球活性化試験 (CD63/CRTH2- FITC フローサイトメトリーによる測定) を検討した (図 1)。1 名が陰性コントロール高値のために測定ができなかったが、11 名は活性化率 40~90% に及び、かつ複数の柑橘類での反応が生じていた。一般的に口腔症状は、外見から判断がしにくいことがある。主観的な症状との区別

できない場合があり、診断に苦慮することがあるが、今回の結果から、FDEIA 群、OAS 群いずれも生体内で IgE-mediated な反応が生じていることが確認でき、本試験によって柑橘類アレルギーの確定診断に役立つものと思われた。

次に症状分類 2 タイプの患者の花粉感作状況について検討した (図 2)。柑橘類アレルギー患者のほぼ全員の患者がスギ花粉に感作、もしくは自覚症状があった。タイプ別にみると、FDEIA 群は、OAS 群に比較して有意にスギ特異的 IgE 抗体価が高かった (マンホイットニー U 検定)。しかし、カモガヤ・シラカンバ花粉の感作状況をみると、FDEIA 群はほぼ感作されていなかったが、OAS 群は、カモガヤ花粉、シラカンバ花粉への感作が有意に高い傾向にあり (t 検定)、これら 2 タイプは異なった感作状況にあることが明らかとなった。この結果によって、柑橘類アレルギー

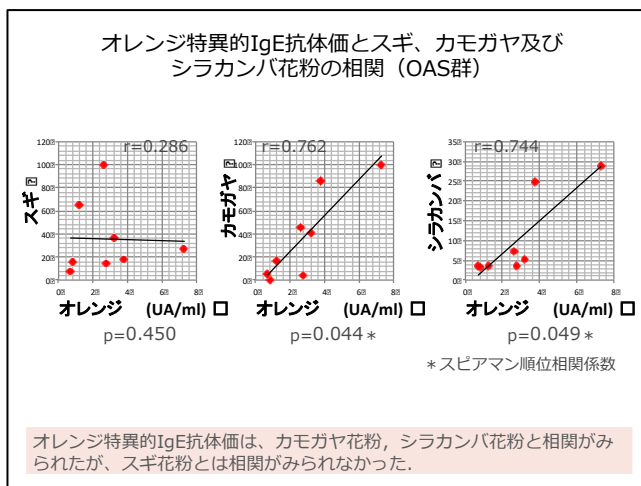


図3 オレンジ特異的 IgE 抗体価と花粉 (スギ、カモガヤ、シラカンバ) との関連

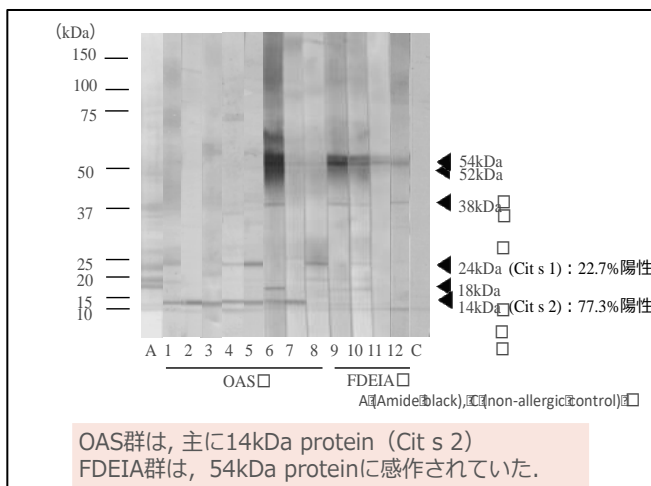


図4 柑橘類アレルギー患者のオレンジ特異的 IgE 結合能

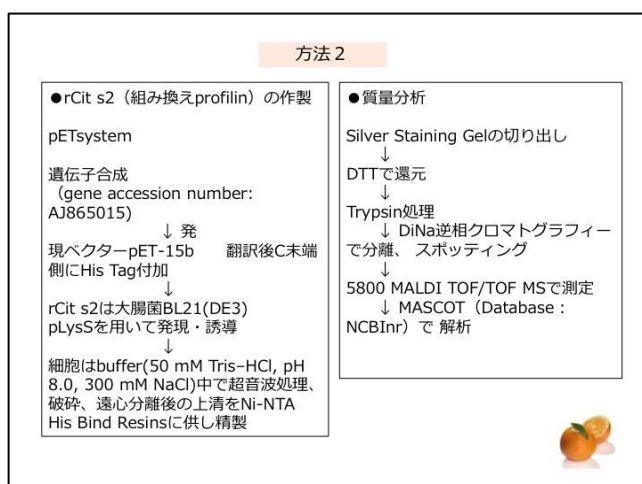


表4 アレルゲン解析方法

OAS 群については、花粉感作との関連性が示唆されたことから、さらに、柑橘類でコマーシャルベースにおける特異的 IgE 抗体価の測定が可能であるオレンジ特異的 IgE 抗体価と、花粉特異的 IgE 抗体価の関連について検討した (図 3)。その結果、オレンジは、スギ花粉との関連はみられなかったが、カモガヤ花粉(スピアマン順位相関係数 : $p=0.044$)およびシラカンバ花粉($p=0.049$)との関連がみられていた。したがって、カモガヤ、シラカンバ花粉とオレンジとの IgE 抗体価に何らかの関連、交差反応が生じている可能性があると考えられた。そこで、柑橘類アレルゲンの検出及び特定を行うとともに、関連性のある花粉と柑橘類アレルゲンとの関連性について検討した。まず患者血清を用いた immunoblot を行い、特異的 IgE 結合能について検討した (図 4)。症状分類 2 タイプで、結合タンパクが分かれる結果となった。OAS 群では主に 14、18、24kDa 付近で、全員が 14kDa に感作されていた。一方、FDEIA 群では、38、52、54kDa 付近に特異的な IgE 結合がみられ、特に 54kDa に共通に反応がみられた。14、24kDa は、既知のアレルゲンである Cit s1、Cit s2 と予想されたが、他のタンパク、特に FDEIA 群の 54kDa は未知と考えられたため、さらに解析を進めた。

未知のタンパクを同定することを目的として、リコンビナントタンパク (Cit s2 及び Cit s1) を作成すると

Band3 (majorなband)

1 **gi1568856679** PREDICTED: enolase-like [Citrus sinensis]
 Mass: 48043 Score: 2411 Matches: 26(21) Protein sequence coverage: 65%

1	MAITITAVKA	RQIFDSRGNP	TVEVDVTTSD	GHVARAAVPS	GASTGIYEAL
51	ELRDGGSDDL	GKGVSKAVSN	VNAIIGPALA	GKDPTTEQTAI	DNYMVGQLDGD
101	TVNEWGWCKQ	KLGANAILAV	SLAVCKAGAH	VKKIPLYKHI	AELSGKNLIV
151	LPVPAFNVIN	GGSHAGNKLA	MQEFMLPVG	ASSFKAMKMM	GVEVYHHLKA
201	VIKKKYGQDA	TNVGDEGGFA	PNIQENKEGL	ELLNTAIAKA	GYTGKVVIGM
251	DVAASEFYGS	DKTYDLNFKK	ENNDGSGKIS	GDALKDLYKS	FISDYPIVSI
301	EDPFDQDDWE	HYAKLTSEVG	EKVQVGGDDL	LVTNPKRVEK	AIKEKTCNAL
351	LLKVNQIGSV	TESIEAVRMS	KQAGWGVMAS	HRSGETEDTF	IADLSVGLAT
401	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	LRIEELGAE	AVYAGAKFRA	PVEPY

8 **gi1568858184** PREDICTED: uncharacterized protein At5g39570-like [Citrus sinensis]
 Mass: 46786 Score: 959 Matches: 9(7) Protein sequence coverage: 34%

1	MPYIADNDD	VTFDDVDYPT	PYDGGYDITL	TYGRPLPSSD	ETCYSSAS
51	DGDFDYARPK	FSHSEPSAY	ADEALNNEYS	SYARPKPRPG	FVPGSGGSG
101	YGGRPQPPA	YGIQGMGRP	EPYSGRSES	EYSGYAKRP	DSQVYSGYG
151	KRPEEYEGS	GYGRKPDSEV	YSGYGRRPE	SGESGFGRRT	ESEYGSAYG
201	RKPEYESGYG	QKPEYESGFG	GKPGYESGYG	SKPEFESGYG	RKPEYESGYG
251	SKPEFESGYG	RKPEYESGYG	SKHDDRSGYG	SKPHESGYGR	KPDYESGYG
301	KPEYESGYGR	KPEYESGYGR	KPEYESGYGR	KPEYESGYGR	GGSGYKFE
351	RKSHGRSDD	EEGKPFSSY	GYERRGDDDE	YSGGSHGYG	GRKKDDSD
401	DDNEKHSHR	KHQHHHRHYD	DE		

図5 MALDI TOF/TOF/ MS、MASCOT によるアレルゲン候補タンパク

ともに、質量分析を行なった(表 4)。14、24kDa は諸外国で報告をされている既知のアレルゲン (profilin 及び germin-like proteins) であることが明らかになった。また、FDEIA 群に共通にみられた 54kDa については、質量分析の結果、enolase と推定された(図5)。

加えて花粉症との関連性を明らかにするために、患者血清による immunoblot inhibition 法を行った(図6)。オレンジと花粉の交差反応に關与する主要アレルゲンは profilin 等と推定され、花粉はカモガヤ、シラカンバで共通抗原性が認められた。

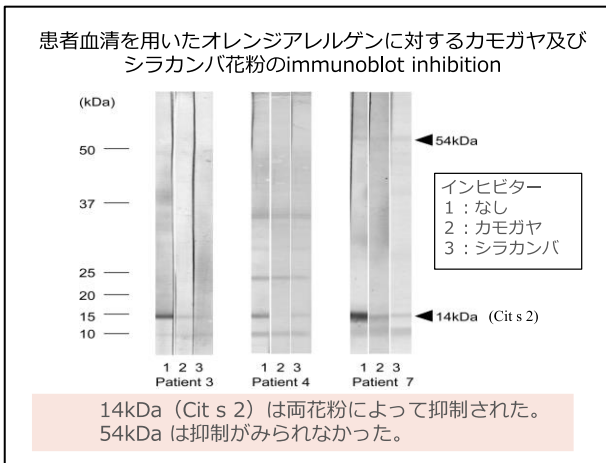


図6 オレンジとカモガヤ、シラカンバ花粉との交差反応性

enolase においては、交差反応はみられなかった。これまでの先行研究では、OAS を有する患者で、果物アレルゲンと交差する花粉タンパクにはシラカンバ花粉が報告されてきているが、原因となる食物(果物)はバラ科果物が挙げられていた。しかし今回の結果から、柑橘類においても交差反応が認められたことが明らかとなった。さらに、国内に広く自生するカモガヤ花粉においても、柑橘類アレルギーを有する患者の一部においては、交差反応が生じることが明らかとなった。

皮膚試験結果

- 柑橘生果実類の全体の陽性率は 48~74%
 柑橘複数で陽性が多い。
- 加工品の陽性率は低かった。
 OAS群は無症状が多い。
- 加工品は摂取しても、軽微な症状が多い。

↓
 加熱によるCit s2の変性
 OAS群に対する低アレルゲン化

SPT	実施数	陽性率 (%)
オレンジ	15	74
ミカン	15	67
ハッサク	13	69
エス	14	57
グレープフルーツ	17	48
ミカン缶	13	23
マーマレード	13	15
オレンジジュース	13	15

表5 柑橘類の調理・加工によるアレルゲン化

原因アレルゲンの Cit s2 (オレンジ profilin)および Cit r2 (ミカン profilin) は、熱により容易に変性することが知られている。そこで調理・加工による低アレルゲン化の可能性を考え、まず、柑橘類加工品を用いた患者皮膚試験(スキンプリックテスト)を行った。柑橘生果実類の全体の陽性率は 48~74%であり、患者個人で複数の柑橘類(オレンジ、ミカン、ハッサク、ユズ、グレープフルーツ)にわたり陽性となったが、加工品(ミカ

ン缶詰、マーマレード、オレンジジュース) の陽性率は生と比較して低かった。また食物経口負荷試験においても、9割は摂取可能な患者で、症状があってもごく軽微な症状におさまっていた。したがって、profilin 感作の患者においては、加熱処理によって、ある程度は柑橘類を摂取できることが明らかとなった (表 5)。

最後に上記患者群とは別に、温州みかんで FDEIA を発症した 1 例を報告した。症例は 12 歳女児。家族歴は父・母：特記すべき事項なし。兄はアレルギー性鼻炎，気管支喘息。既往

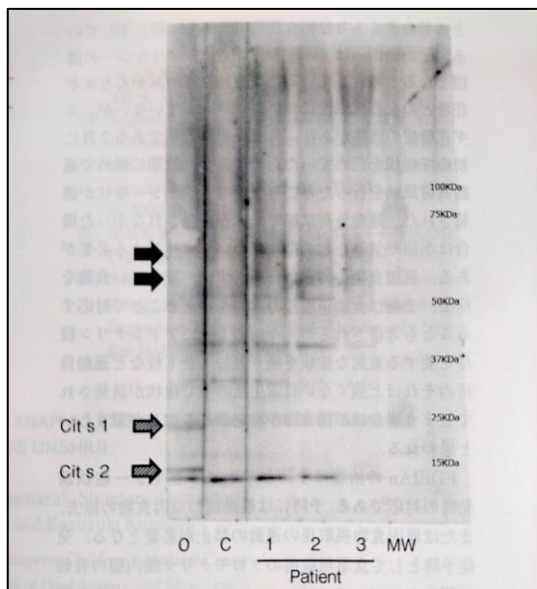


図 7 温州みかん FDEIA 患者の IgE 結合能

歴：アレルギー性鼻炎。現病歴：海鮮ピザを摂取した後、走って帰宅中に足に膨疹が出現した。膨疹は全身に拡大し、咳嚔・呼吸苦も出現したため以前に処方されていた抗ヒスタミン薬を内服して近医を受診した。受診時、全身の膨疹・呼吸苦に加え、78/46mmHg と血圧低下を認めため、アナフィラキシーショックと判断し、アドレナリン筋注とステロイドの全身投与の処置を行って症状は軽快した。経過から食物依存性運動誘発アナフィラキシーが疑われたため、症状誘発時に摂取していた卵，乳，小麦の除去が開始され、また症状誘発時に備えエピペンが処方された。その後、原因食物の精査を目的に病院へ紹介となった。以前にも給

食摂取後の食物摂取後の運動負荷によるアナフィラキシー症状を繰り返したため、FDEIA を疑い原因食物の精査を行った。症状誘発時に摂取頻度の高かった卵・乳・大豆と、原因食物として頻度の高い小麦について、それぞれの食物摂取後の運動負荷試験を施行したが全て陰性であった。運動負荷試験前に温州みかん摂取単独では症状が誘発されないことを確認した。ASA (サリチル酸) を併用した運動負荷試験で膨疹、喘鳴、血圧低下などのアナフィラキシー症状が誘発され、温州みかんによる FDEIA と診断された。症状誘発時に温州みかんを摂取していないエピソードが 2 回あったが、症状誘発時に食事を摂取した店に確認したところシーフードサラダに使用していたドレッシングにレモンが含まれていることが判明した。またもう 1 回のエピソードでは給食の献立からポンカンを摂取していることがわかった。

多数の柑橘類で SPT 陽性を示したため、柑橘類の完全除去を指示したところ、それ以後アナフィラキシー症状は認めていない。本症例の immunoblot (ImageQuant による ECL 検出) においても、50-60kDa 付近に特異的な IgE 結合が認められた (図 7)。

3. 研究成果の副次的効果と今後の計画

食品表示法では、オレンジは特定原材料に準ずる食品であり表示を推奨されている。しか

し対象となる食品は、バレンシアオレンジ、ネーブルオレンジなどのオレンジ類に限られている。温州みかんやグレープフルーツ、レモンなどの他の柑橘類は対象外であるため、アレルギーがあっても、加工食品中の柑橘類を完全に回避することは難しい。このように **profilin** 感作の患者の場合には、交差反応によって広く植物性食品に症状をきたす可能性があることに留意すべきである。**profilin** を有する植物性食品のアレルゲン性については、柑橘類と同様の傾向を示すと予想され、他食品の研究への応用（副次的効果）が期待される。

今後の計画は、柑橘類の加熱による低アレルゲン化の可能性がみいだされたことから、水煮、蒸し、加熱殺菌、電子レンジ加熱、あるいは調理済み食品、ジャムやソース、缶詰製品などのアレルゲンを定量し、アレルギー対応食品の継続検討を行うとともに、患者血清及び経口負荷試験による反応評価を行ないたい。また、最近では花粉症の交差反応による果物アレルギー（花粉果物アレルギー症候群）の増加が指摘されており、これらの関連性と花粉免疫療法による果物アレルギーの改善例みられることから、これらのメカニズムにおいても、抗原特異的 IgE、IgG4、好塩基球活性化試験によって明らかにする予定である。

研究タイトル：②食物アレルギーの自然歴に関する研究

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 食品加工学研究室

担当者職名：教授 高松伸枝

研究協力者：久保田優、藤森安里、樋園和仁

1. 研究の目的

日本では食物アレルギー（FA）の罹患が増加傾向にある。東京都3歳児全都調査によれば、平成11年度は7.1%であったものが、平成26年には16.7%と増加している。食物アレルギー患者実態については、厚生労働科学研究班による医療機関に受診した患者の全国調

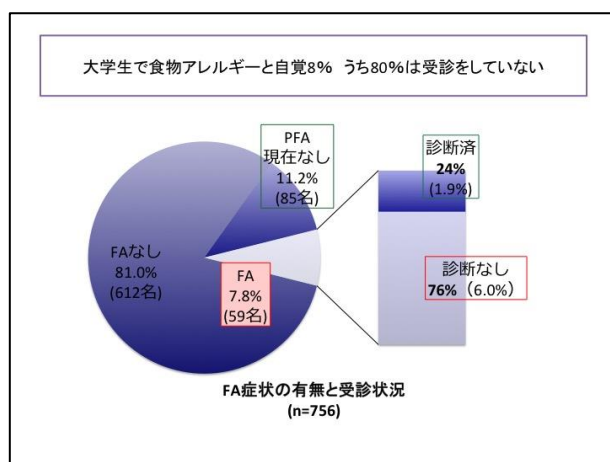


図1 調査対象の背景

査で、乳児約10%、3歳児5%、学童以降が1.3~2.6%とされている。しかし、これまでの全国調査は専門医の常駐する医療機関に受診者のみを対象としたもので、一般人を対象とした調査はみあたらない。そこで今回は、一般大学生を対象として食物アレルギー及びその関連疾患の自然歴を検討し、今後アレルギー対応の商品開発のための資料とすることを目的とした。

2. 研究内容

奈良県及び大分県在住の大学生 768 名を対象に、自記式の集団調査法を行った。回収率は

98.0%、年齢は 20.19±1.35 歳であった。質問は、アレルギー疾患の有無、アレルギーの種類（花粉症の有無）、症状、既往歴、原因食物、軽快もしくは寛解時期などとした。結果は、エクセル統計にて集計し、 χ^2 検定を行なった。

アレルギー疾患の既往のある者は全体の 52.4%であり、花粉症が 29.6%を占めていた。

アレルギー疾患のうち食物アレルギーをみると、現在食物アレルギーと思われる症状をもつものが 7.8%、以前は食物アレルギーであったが、現在は症状がないものが 11.2%いた。現在食物アレルギーがあるもののうち、医師からの診断があったものが 24%（全体の 1.9%）で、そのほかは医療機関を受診せずに、自己判断で自覚症状があると答えていた（図 1）。次に、過去に FA 症状があり寛解したと答えた者を PFA 群、現在 FA 症状があると答えた者を FA 群として比較検討を行った（表 1）。

FA 群の中で診断を受けていた者は 23.7%であった。PFA 群の原因食物は鶏卵 39.4%、甲殻類 1.9%、魚類・乳類 11.7%で、症状は、口腔周囲のかゆみを訴えるものが最も多く、次に皮膚症状を呈していた。中には全身症状を経験したのも 3%程度存在した（図 2）。

PFA 群の初発頻度は 0 から 12 歳まで漸増するも、寛解する者も 2~3 歳頃から徐々に増え、15 歳までに 62.7%に達した。一方 FA 群の原因食物は甲殻類 30.5%、果物類（キウイ 23.7%、メロン 13.6%）などで口腔周囲の症

大学生アレルギーの原因は、甲殻類、果物(キウイ、メロン)が多い

原因食物	(複数回答)	
PFA n=94	FA n=59	(%)
鶏卵	39.4	甲殻類 30.5
甲殻類	14.9	キウイフルーツ 23.7
乳・乳製品	11.7	メロン 13.6
魚類	11.7	鶏卵 11.9
キウイフルーツ	5.3	乳・乳製品 10.1
そば	4.3	魚類 10.1
小麦	4.3	すいか 6.8
メロン	4.3	柑橘類 6.8
その他	38.3	その他 61.0

表 1 食物アレルギー発症時期別の原因食物の頻度

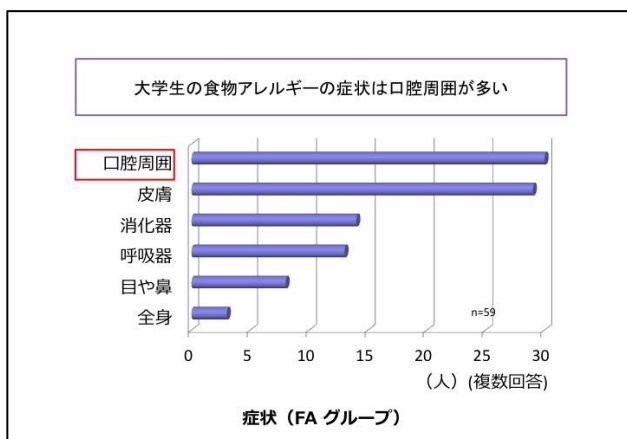


図 2 食物アレルギーの症状別頻度

現在の食物アレルギーは学童期以降に発症する者が多い

years	発症と寛解時期 (%)		
	発症(PFA) n=94	寛解(PFA) n=94	発症(FA) n=59
old			
0	6.4	-	3.4
1	10.6	-	0
2-3	18.1	8.5	10.2
4-6	16.0	19.1	11.9
7-11	27.7	19.1	25.4
12-14	5.3	16.0	25.4
15<	16.0	37.2	23.7

表 2 食物アレルギーの発症と寛解時期

状が多かった。柑橘類は 6.8%であった。FA 群の発症時期は 6 歳以降が 74.5%を占めており、幼児期にはこれら原因食物が摂取可能であったが、小学校入学以降に、症状を訴えてきた様子うかがえた (表 2)。

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画

今回の調査では、全国調査と比較して PFA、FA 群ともに小麦の頻度が低く (<5%)、花粉症のある者は有意に果物の発症頻度が高かった(χ^2 検定 $p < 0.0001$)。FA の自覚症状があっても未受診の者が受診者の約 4 倍存在し、これまでの調査に反映されない潜在的な患者が存在することが示唆された。今後花粉症の増加にともなって、花粉果物アレルギー症候群 (PFAS) の罹患率も増加すると懸念されるため、これら患者をターゲットとした新規食品開発への副次的な方向性も考えられた。

最近ではべにふうき茶など花粉症の緩和を目的としたハーブティーの商品販売が行われている。また基礎分野ではアレルギー疾患と腸内細菌叢の関連性の検討もなされている。今後はヨーグルト製品等発酵食品の機能性、商品開発についても検討する計画である。

研究タイトル：③ビールアレルギーに関する検討

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 食品加工学研究室

担当者職名：教授 高松伸枝

研究協力者：近藤康人、柘植郁哉、有田孝司

1. 研究の目的

一般に味噌、醤油などの発酵食品は、発酵・熟成によるタンパクの分解、アミノ酸の生成とともに、原料のアレルゲンが減少、消失が知られているが、発酵飲料であるビールにおいては、アレルギーの症例報告が諸外国でなされている。本邦ではあまりなされていず、今回ビールによるアナフィラキシー症状を来した症例について検討した。

2. 研究内容

症例は、2011 年 5 月お好み焼きとビールを摂取後、両上腕部に小発疹が出現。2012 年 3 月、夕食 18 時頃、つけ麺摂取とワイン、ビールを摂取中に体の痒みと発疹を自覚。19 時頃ピザとスパゲティ、ワインを摂取し、痒みと発疹が継続。会計に行く途中に耳鳴りと酸素が少ないと感じた後、意識消失、救急受診した。これまでにアレルギー疾患の既往はなかった (表 1)。

症 例	
症例：51歳女性	
●エピソード	
2011年5月	お好み焼きとビールを摂取し、両上腕部に小発疹が出現。
2012年3月	18時頃つけ麺とワイン、ビールを摂取中に体の痒みと発疹を自覚。19時頃、ピザとスバゲティ、ワインを摂取。痒みと発疹が継続。会計に行く途中に耳鳴りと息のしにくさを感じ、意識消失。(1~2分)
2012年4月	18時頃トンカツとビールを摂取。ビールを2口飲んだ後、口周囲の腫れるような感じを自覚し、抗ヒスタミン剤を服用したが、顔・首・指まで発疹が出現。少し息苦しさがあったが、翌日は発疹消失。負荷試験入院。

表 1 ビールアレルギー患者のエピソード

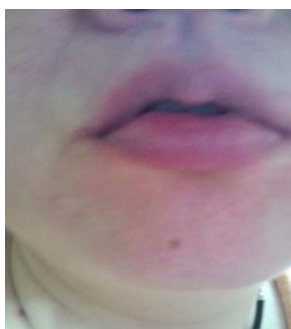


写真 1 ビール摂取後の患者写真
口唇の腫脹と口腔周囲の発赤

を行ったが症状誘発なく、ビール A に含まれる何らかの成分によるアナフィラキシーと診断され、ビール A の摂取を中止したのちは症状の誘発はみられていない。

原因となる抗原タンパク質の同定を目的として、SDS-PAGE、immunoblot、及びアミノ酸配列分析を行なった。ビール抽出物と患者血清のイムノブロット結果では、45kDa 付近に患者血清との特異的な IgE 結合がみられた (図 1)。また本 band のアミノ酸配列 (島津製 PPSQ-30) は DENQSTHGAYRCMVPWFKIL と決定されたが、タンパク質の特定には至っていない。

検 査 (2012年3月14日)	
<ul style="list-style-type: none"> ・特異的IgE抗体価 (Immuno CAP) 	<ul style="list-style-type: none"> ・食物経口負荷試験
<ul style="list-style-type: none"> ω5グリアジン ヤケヒョウダニ ハウスダスト1 カンジダ 小麦 アーモンド エビ すべて 0.34UA/mL以下 	<ul style="list-style-type: none"> 1日目 Aビールのみ摂取 10mlから160mlまで30分毎負荷。 5分後に口周囲、頭、肩の痒み。 160mlで全身蕁麻疹出現。 Bビールのみ及びBビールとお好み焼き負荷で誘発症状なし。 2日目 Bビール、ワイン、Cビール160ml負荷で症状なし。 Aビール160ml負荷で全身蕁麻疹。

表 2 ビールアレルギー患者の検査結果

両方を同定している。日本の症例報告では、主抗原は 20~25kDa のタンパク質であった。日本におけるビールの原料は、酒税法にて麦芽、ホップ、コメ、トウモロコシ、デンプン、

検査項目として測定可能な特異的 IgE 抗体価の大麦、麦芽、ビール酵母等で陰性、スキンプリックテスト陰性。食物経口負荷試験では、ビール A を 160ml 負荷で、頸部、上背部、上腕、下腹部に蕁麻疹が出現した (写真 1, 表 2)。血圧は蕁麻疹出現時 172/95 で d-クロルフェニラミンマレイン酸塩 0.5A 静注。同時摂取したお好み焼きとビール B の同時摂取、およびビール B、C の各 160ml 単回摂取、赤ワイン 100ml 単回摂取

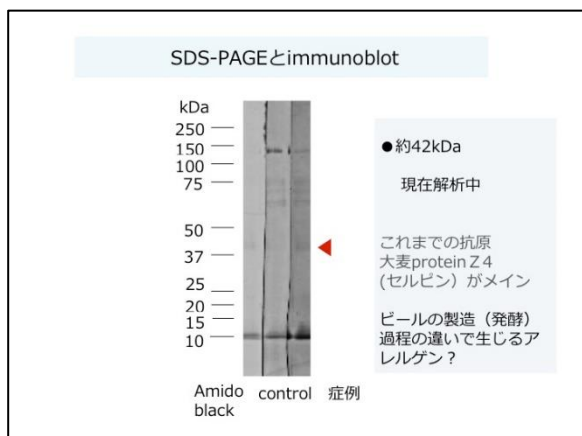


図1 ビールアレルギー患者のIgE結合能

の原因タンパク質は、イムノブロットにおけるIgE結合タンパク質の分子量から推定してプロテインZ型セルピンが示唆されたが、先行研究の症例とは異なる病態もあることから、原料や酵母の違いや発酵過程による特定の分解産物の可能性、あるいはアミノ酸配列が特定できない一因として異なる耐熱性タンパク質の重複も考えられた。

糖類の使用が認められている。原料の大麦やホップの多くは輸入品であり、ビール製造各社によって、用いる原料品種や配合割合も異なっている。製法は、発芽大麦を焙燥後に糖化、さらにホップを加えて煮沸し、各社独自のビール酵母を加えて発酵、熟成後製品化する。主原料の大麦や麦芽には、アレルギーであるプロテインZ型が最も豊富に含まれ、LTPと同様、加工処理に安定なタンパク質であるため加工品においても反応性が高いとされている。今回の症例

3. 研究成果の副次的効果、今後の計画

代表的なアルコール発酵飲料であるビールアレルギーに関する研究は、本邦ではこれまでほとんどなされていない。アレルギーの解析結果は、患者への指導資料として副次的に活用可能である。

今後は、ビールアレルギーの解析を継続して行う。大麦・ホップ由来、あるいは発酵・熟成中に生じる成分等を明らかにし、ビール特異的なアレルギーを含まない製品管理のための資料提供が可能である。ひきつづきN末端アミノ酸配列解析を進めるとともに、2D-Western blottingによる分析、検討を続けたい。

4. 研究成果

a)原著論文

1. 小野倫太郎、本村知華子、高松 伸枝、近藤 康人、赤峰 裕子、松崎 寛司、村上 洋子、網本 裕子、田場 直彦、本荘 哲、柴田瑠美子、小田嶋 博：オレンジによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの1例、アレルギー、2015, 64(2)149-154.
2. 高松伸枝、近藤康人、是松聖悟：患児と家族の食のQOLを考慮した食物除去と解除の支援、日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌, 2015, 13(3)249-253.
3. *Fujimori A, Yamashita T, Kubota T, Saito H, Takamatsu N, Nambu M. : Comparison of the prevalence and characteristics of food hypersensitivity among adolescent and older women. APJCN, 2016, 25(4)858-862.
4. *高松伸枝、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄：オレンジアレルギー患者血清を用いた

柑橘類の交差抗原性の検討、藤田学園医学会誌、2016, 39(1)51-53.

5. *Takamatsu N, Kondo Y, Tsuge, I, Nakajima Y, Naruse, N, Tanaka K, Inuo, C, Hayashi T, Matsuda T, Yoshikawa T, Urisu A. : Study of Cross-Reactivity Between Citrus Fruit and Pollen Allergens in Oral Allergy Syndrome and Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis in Japan. The Fujita Medical Journal, 2016, 2(1)6-11.
6. Narabayashi N, Okafuji I, Tanaka Y, Tsuruta S, Takamatsu N. : Anaphylaxis caused by casein used in artificially marbled beef: A case report. Allergology International, 2016, 65, 341-342.
7. *田中裕、松原麻理恵、津曲俊太郎、高松伸枝、栗原和幸：温州みかんによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの1例、アレルギー、2017, 66 (8)1011-1015.
8. *高松伸枝、有田孝司、近藤康人：ビール摂取によるアナフィラキシーと診断された一例、別府大学大学院紀要、印刷中.
9. 近藤由理、高松伸枝：食物アレルギー対策事業のニーズに関するアンケート調査、別府大学紀要、印刷中.

b) 総説

1. 高松伸枝：集団給食における食物アレルギー児への対応の現状、チャイルドヘルス、2015, 17(10)9-12.
2. 高松伸枝：日本の伝統食品うるか、食品と容器、2015, 56, 482-485.
3. 西間三馨他：アレルギーの子どもの学校生活、慶應義塾大学出版会、2015, 158-176.
4. 長浜幸子他：実践臨床栄養学実習、第一出版（株）、2016, 58-72.
5. 宇理須厚雄他：加工食品のアレルゲン含有量早見表 2016、平成 27 年度消費者庁政策調査費、2016.
6. 宇理須厚雄他：食物アレルギーの子どものためのレシピ集、(独)環境再生保全機構、2016.
7. 宇理須厚雄他：食物アレルギーひやりはっと事例集 2015、平成 27 年度消費者庁支出委任費、2016.
8. 大分県医師会：学校・幼稚園における食物アレルギー対応の手びき大分県版、2016.
9. 宇理須厚雄他：加工食品のアレルゲン含有量早見表 2017、平成 27 年度消費者庁政策調査費、2017.
10. 宇理須厚雄他：食物アレルギーひやりはっと事例集 2017、平成 28 年度消費者庁支出委任費、2017.
11. *高松伸枝、近藤康人：花粉症と関連する食物アレルギー、栄養、2017, 24, 224-228.
12. 日本小児難治喘息アレルギー疾患学会：食物アレルギーレシピ集、2018.
13. 海老澤元宏他：食物アレルギーの栄養食事指導の手引き 2017、厚生労働科学研究費、2018.
14. *高松伸枝：食物アレルギーの栄養食事指導、日本栄養士会雑誌、2018, 61, 6-9.
15. 高松伸枝他：食物アレルギーお弁当 ABC、第一出版（株）（印刷中）

16. *海老澤元宏他：食物アレルギーの栄養指導、医歯薬出版（株）（印刷中）

c)招待講演、シンポジウム

1. *高松伸枝：臨床現場からみる食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA）、日本体力医学会シンポジウム 11、2017年9月17日（松山大学）松山市
2. 高松伸枝：食物アレルギーに関連した栄養士・管理栄養士認定制度における PAE の関わり、日本小児アレルギー学会 エducーター企画 2017年11月18日（ホテル東日本）宇都宮市
3. 高松伸枝：PAE 過疎地域でのちいさな活動、日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会ワークショップ、2017年7月23日（ピアザ淡海）大津市

d)国際学会

1. *Takamatsu N, Fujimori A, Nagai A, Kubota T, Tezono K. : Past and Present Symptoms of Food Allergy in University Students, The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism(ESPEN), 2015.
2. Narabayashi N, Okafuji I, Tanaka Y, Tsuruta S, Takamatsu N. : Individuals Allergic to Cow's Milk Should be Vigilant When Consuming Beef Because It May be Injected Beef. XXIV World Allergy Congress (WAC 2015), 2015.

e)国内学会

1. 2017年 日本小児臨床アレルギー学会3件、日本アレルギー学会2件、日本小児アレルギー学会2件、日本栄養改善学会1件、西日本小児アレルギー研究会1件
2. 2016年 日本小児アレルギー学会1件、日本栄養食糧学会1件、日本栄養改善学会1件、日本小児科学会1件
3. 2015年 日本アレルギー学会2件、日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会1件、日本栄養改善学会学術総会1件、日本小児アレルギー学会2件

f)特許

なし

g)その他（学会賞、報道など）

なし

私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：発酵食品の生体への影響

プロジェクトでの役割：発酵食品の予防医学への寄与

研究タイトル：①発酵大麦エキスの新規機能性の探索

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 感染・代謝免疫学研究室

担当者職名：教授 仙波和代

研究協力者：新名宏二（株式会社ゆふ・は）、岩瀬伸子（明礬温泉 岡本屋）
丸岡生行、外菌英樹（三和酒類株式会社 三和研究所）、米元俊一（別府大学）

1. 研究の目的

焼酎の製造に伴って、蒸留工程後に焼酎蒸留粕が排出される。この焼酎蒸留粕には高濃度の有機物が含まれているため、長年処理は困難とされ海洋投入が行われてきた。しかし 1997 年、ロンドン条約を背景とする改正海洋汚染防止法の制定により、焼酎粕の海洋投棄が全面禁止となった結果、海洋投入から焼却やメタン発酵といった陸上処理へと移行してきた。一方、焼酎蒸留粕には豊富な糖類、ミネラル、タンパク質などが含まれているため、その有効利用を目的とした研究開発が盛んに行われている現況がある。これまでも別府大学は「発酵大麦エキス・アルコケアのマウス腸管免疫活性化作用」の報告などを行ってきている。本研究では発酵大麦エキスのメタボローム解析を行い、現在までに報告されている発酵大麦エキスの機能をふまえながら考察を行った。

2. 研究内容

【実験方法】

株化樹状細胞(JAWS II 細胞：ATCC より購入)を 5×10^5 個 / well にて 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後にアルコケアを 5%濃度になるように添加した。48 時間後に細胞培養上清を回収し、メタボローム解析を行った (HMT ; Humna Metabolome Technologies 山形県 に委託)。メタボローム解析とは「代謝物質の種類と濃度を網羅的に分析・解析する手法」のことであるが、疾病や環境要因の変化に伴い、どの代謝系が動き変化をするのか分析する手法のことである。

【結果・考察】

今回のメタボローム解析の結果、2つの産物において差が認められた(図1)。アルコケア添加培地ではグルコース-6-リン酸(G6P)量が多くなっていた。これはアルコケア中にグルコース量が多く存在していたからであるが、アルコケア由来のG6Pの多くがペントースリン酸系に利用されていることが、リブローズ5リン酸(Ru5P)の増加より推定できる。ペントースリン酸経路は最終的には核酸や脂肪酸の合成と関わっているが、1分子のG6Pから1分子のCO₂と2分子のNADPHが生成される。生成されたNADPHの機能は多くの報告が既に教科書にも記載されており、脂肪酸合成、過酸化物の無害化(抗酸化作用)、過酸化水素生成と処理(殺菌)、p450酵素による解毒、NADPHオキシダーゼでスーパーオキシドをつくり細菌を破壊する、NO産生などがあげられる。アルコケア添加ではこれら全ての作用が亢進していると推定できる。本稿では、本研究結果について、NADPHの抗酸化作用、NO産生機能、そしてこれまでの研究報告を交えながら考察を加える。

現在までに報告されているアルコケアの肝障害抑制メカニズムは、①アルコール摂取によって亢進した細胞内NF-κBを抑制することで、炎症性サイトカインの産生を低下させる、②アルコール摂取により発生した活性酸素を消去する、の2つであるが(図2参考)、どのようなメカニズムで活性酸素を除去しているのか詳細が不明のままであった。今回のメタボローム解析の結果、アルコケアはペントースリン酸経路を活性化させることにより、NADPHを産生させ、活性酸素を消去することが解明された。NADPHは酸化グルタチオンを還元型に変換するが(図3参考)、この還元型グルタチオンは、自らが酸化型グルタチオンになることにより、強力に活性酸素種を還元し消去する。

また本研究チームでは、アルコケアをマウス脾臓細胞に添加するとIL-6が低下することを既に報告している。IL-6はTh2細胞から産生されるサイトカインの1つである。免疫系には古典的なヘルパーT細胞(Th)の概念としてTh1/Th2バランスが存在しているが、Th1はIL-12によって誘導され細胞性免疫を活性化し、Th2はIL-4によって誘導され液性免疫を活性化させる。このバランスは免疫系の制御に深く関与している(図4参考)。アルコケアはIL-6を低下させることからTh2応答を低下させTh1応答優位の免疫状態にしている。

本研究に使用した細胞は免疫系の中核である樹状細胞であるが、アルコケア添加によりペントースリン酸経路が活性化し、NADPHが産生され、Th1系物質であるNOも産生が亢進したと考えられる。NOはアルギニンにNADPHが作用することにより生じるガス性セカンドメッセンジャーであり、微生物の感染において強力な防御物質として機能している。これまでも発酵系食品にはTh2を抑制しアレルギー症状を改善するという報告があったが、本研究結果からも同様のTh1応答優位(Th2応答低下)を示唆する結果を得ることができた。

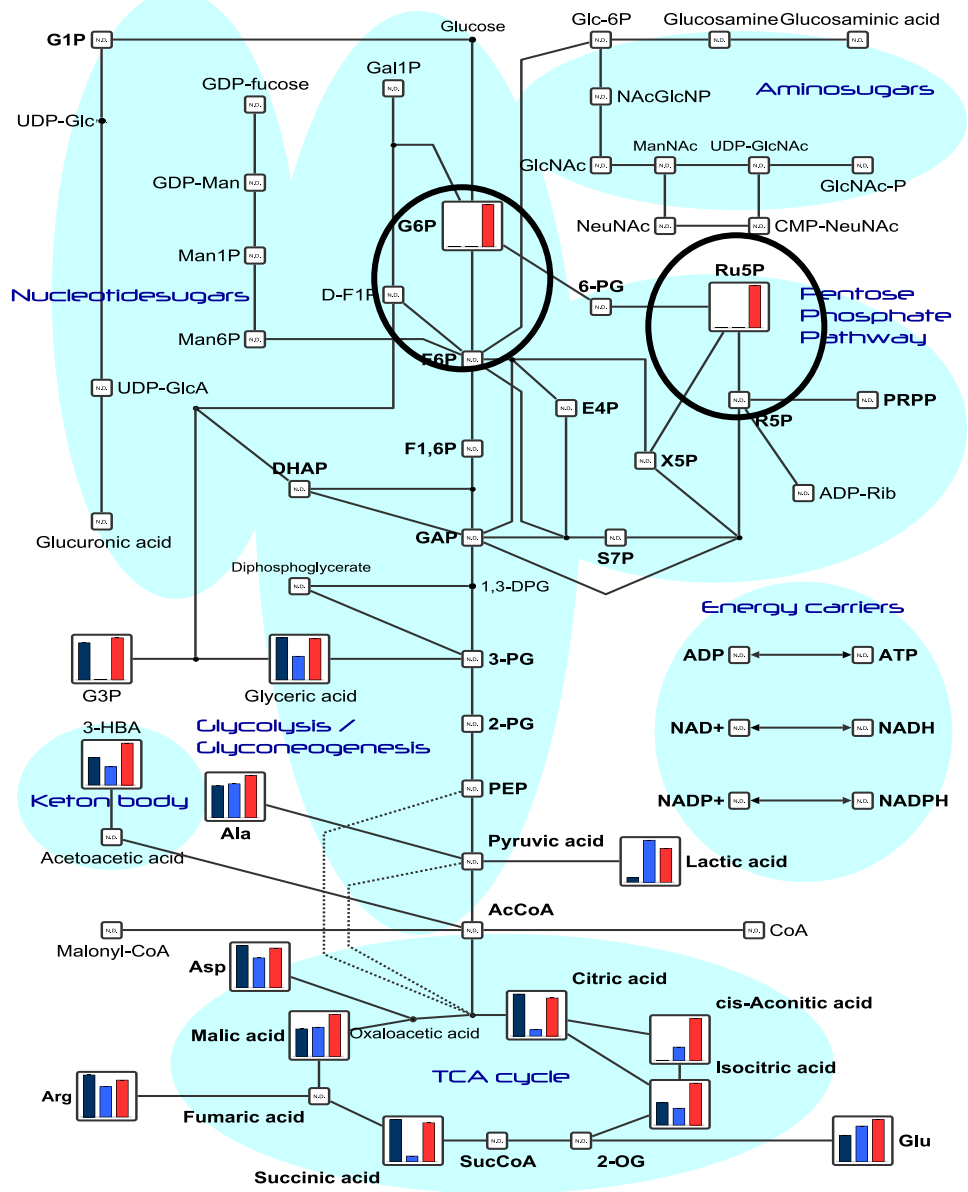


図1：メタボローム解析の結果、差が認められたグラフ（○）とその代謝経路
 棒グラフ左；アルコケア添加培養液
 棒グラフ中央；細胞培養液
 棒グラフ右；アルコケア添加細胞培養液

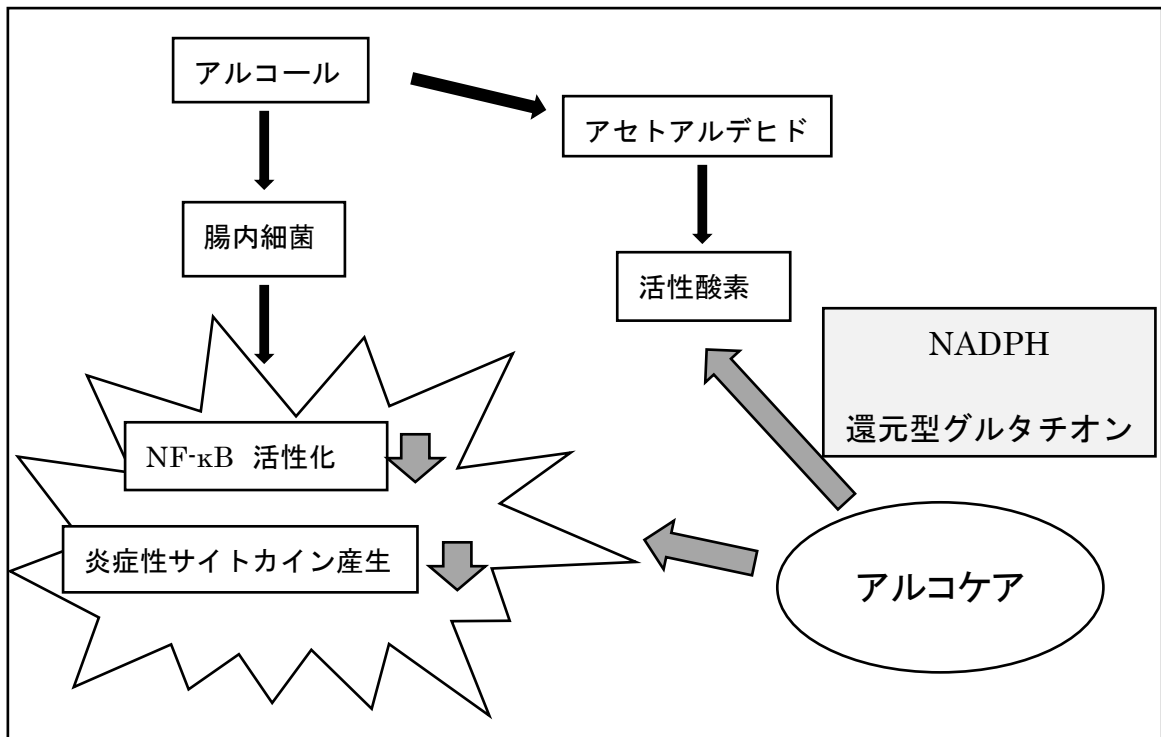


図2. アルコケアの肝障害抑制作用 (三和酒類株式会社 提供)

アルコール摂取により、腸内細菌はマクロファージの TLR4 を介し NF-κB を活性化し、炎症性サイトカインの産生を促す。アルコケアはマクロファージ内の NF-κB 活性化を抑制することにより、炎症性サイトカインの産生を制御している。またアルコールは活性酸素を作り肝細胞にダメージを与えるが、アルコケアは NADPH 産生により、産生された活性酸素を消去する。

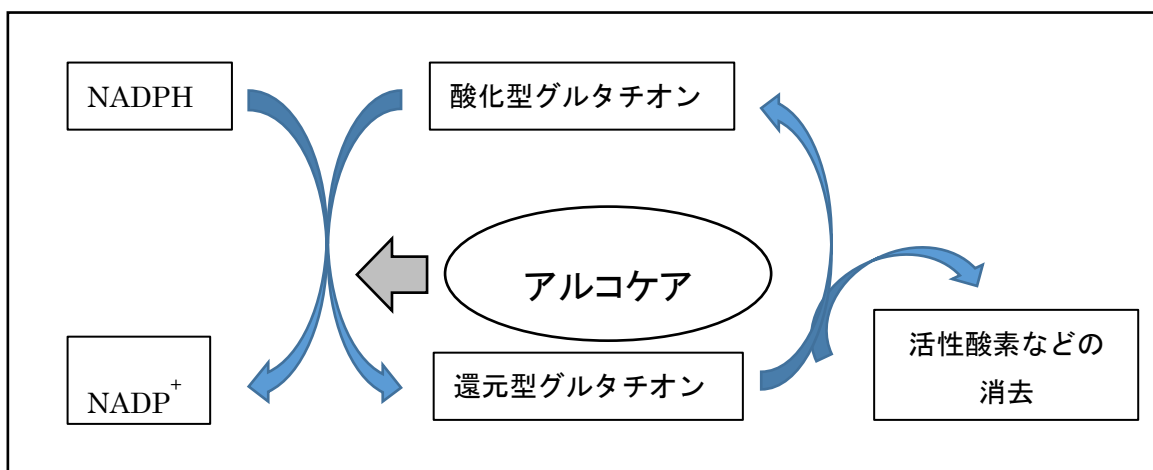


図3. グルタチオンと NADPH の関係 (参考: レーニンジャーの新生化学)

アルコケアによって産生される NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに還元する。

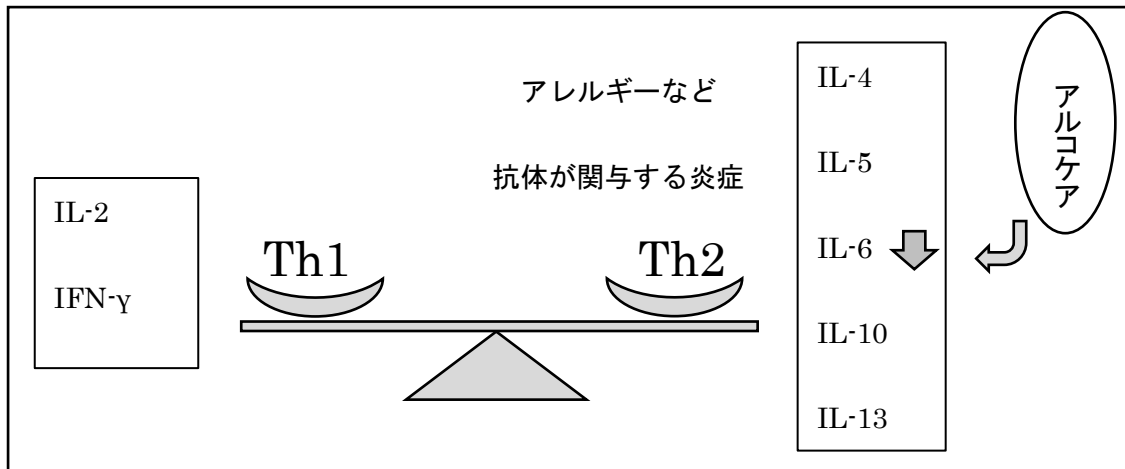


図4. Th1 Th2 バランス (第66回日本栄養・食糧学会にて発表)

アルコケアはTh2応答を低下させ、その結果Th1応答を高める。

3. 研究成果の副次的効果

発酵大麦エキスには活性酸素除去効果があることが報告されているが、本研究結果よりそのメカニズムはNADPHの産生である可能性が示された。NADPHの産生に影響を与える食物やサプリメントは少なく、既存の抗加齢効果とは異なるメカニズムによる抗加齢効果を有するサプリメントの開発が期待できる。これは健康寿命の延長にもつながり、医療費の削減につながるかもしれない。

今後の計画など

実際に継続して発酵大麦エキスを摂取した場合、寿命延長効果があるのか、さらに寿命延長効果まではいかなくとも、抗老化作用があるのか、細胞ではなく動物を使って実験を行う予定である。

研究タイトル：②別府市特有の「湯の花」の機能解析と商品開発

研究機関：食物栄養科学部 食物栄養学科 感染・代謝免疫学研究室

担当者職名：教授 仙波和代

1. 研究の目的と学術的背景

【目的】

大分県別府市は温泉地として有名な町である。別府温泉が他の温泉と異なる特徴は、単なる楽しみとして温泉につかるだけでなく、歴史的に「疾病や怪我の治療・療養」として発展してきた点にある(表1)。これら歴史的な背景のお蔭で、別府市は現在でも日本有数の

湯治客を誇っており、湯治客用の設備も整っている。これまで別府温泉に関してはいくつかの科学的研究が報告されており、温泉泉質の効能、飲泉・鉱泥の効果（別府市資料）、また「地獄蒸し」に関する味や調理方法の研究もある。

一方、別府には重要無形民俗文化財として「湯の花製法」がある。この製法で栽培された「湯の花」は温泉の成分ではないが、入浴剤として販売されており、その効能の表示を見ると「あせも・いんきん・うちみ・肩こり・くじき・神経痛・しっしん・しもやけ・痔・ただれ・たむし・冷え性・水虫・腰痛・リウマチ・かいせん」と記載されている。しかしながら、「湯の花」の効能を科学的に検証した研究論文はほとんど無く、「別府の「湯の花」は硫黄噴気を利用して栽培される、よって硫黄の効能と同じである」という論法で記載されていることが分かった。温泉入浴や入浴剤に関する事項は、薬事法ではなく「温泉法」「温泉法施行令」「温泉法施行規則」で定められているため、効能表示に、必ずしも科学的証明が必要ないためであった。

別府の「湯の花」は小屋内で栽培される。温泉ガスが均等に小屋内で噴出できるように栗石で石畳みを作り、その上にモンモリロナイト（青粘土）を敷き詰め、硫黄噴気と青粘土が化学反応を起こしてできた結晶を成長させ、採取、精製して作り上げる（図5）。つまり「湯の花」は、温泉と同一の噴気は利用するが、温泉の泉質とは全く異なる天然化学反応生成物であり、この製法は世界中で別府にしか無く、1日に1mmずつ結晶を成長させて、丁寧に作り上げられた別府の特産物であると言える。

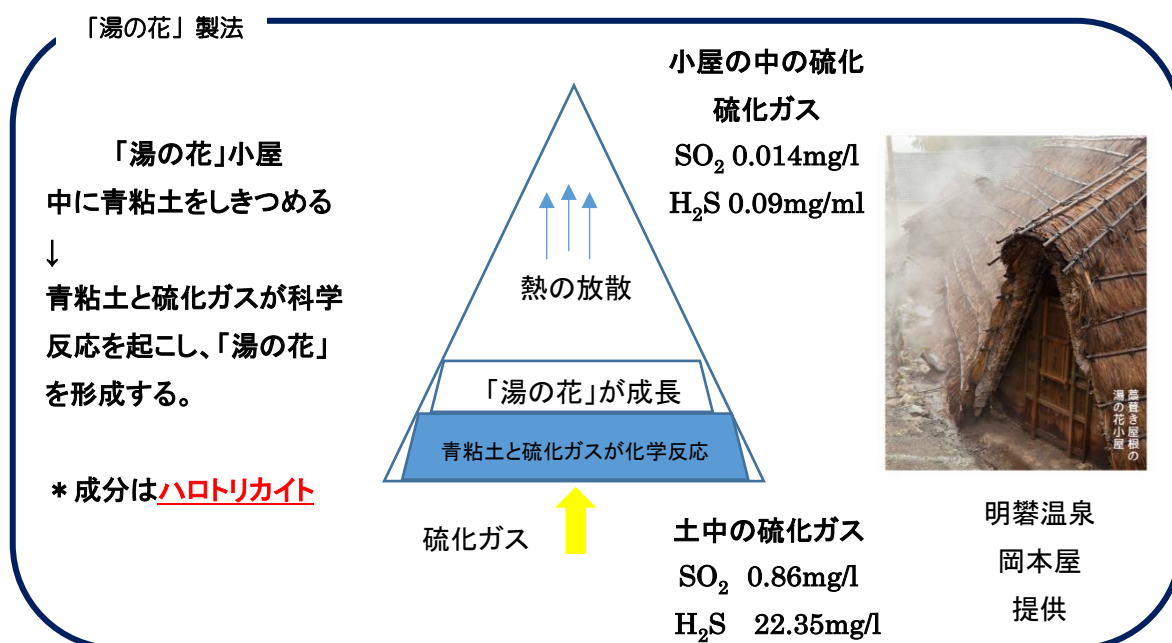


図5. 湯の花製法と硫化ガス

以上のことから別府特有の「湯の花」が、皮膚を介して、本当に私達の健康に影響を与えているのか科学的に研究することを試みた。

時期	記述内容
8世紀初め	神代の昔、少彦名の命が病を得て卒倒した時、嘆き悲しんだ大国主の命が、別府の温泉を道後へ運び、病気が回復した（神話）。
鎌倉時代	大友頼泰が元寇の役で傷を負った武士を癒すため、別府、鉄輪、浜脇などに療養所をつくった。
明治時代 大正時代	陸軍病院開設 海軍病院開設 現) 国立病院機構別府医療センター
昭和6年	九州大学温泉治療学研究所開設 現) 九州大学別府病院
昭和35年	原子爆弾被爆者別府温泉利用研究所開設

(表1) 別府温泉の歴史

【学術的背景】

別府「湯の花」の健康に関する**先行研究は無く**、私達が初めての着手となる。研究の方向性を考える際に参考とした学術的背景を記載する。

(1) ミョウバンの機能について

別府「湯の花」の主成分はハロトリカイトやアルノーゲンなどの天然アルミニウム硫酸塩（ミョウバン）である。ミョウバンは1世紀近くアジュバントとしてワクチンに使用されており、長年そのアジュバントメカニズムは不明であった。しかし近年、ミョウバンの免疫活性機能メカニズムはインフラマソームの活性化によるものであることが報告された。「湯の花」の主成分はミョウバンであるが、*in vitro*にて生成している訳ではなく、天然資源を用いて反応させていることから、純粋なミョウバンとは考えにくく、恐らく様々な反応物が混合していると考えられる。よってミョウバンに類似した免疫活性機能は推測されるものの、全く同じかどうかは分からない。以上のことから本研究では「湯の花」の免疫機能を探索することとした。

(2) アトピー性皮膚炎について

アトピー性皮膚炎は小児に発症することの多い皮膚疾患で、他のアレルギー疾患と合併し得ることから、アレルギー性炎症であると考えられてきた。しかしながら生体が何に反応しているのかは不明で、原因となるアレルゲンは長らく特定されていなかった。ところが、2015年 *immunity* にて、アトピー性皮膚炎は皮膚の異常細菌叢が原因であり、黄色ブドウ球菌とコリネバクテリウムを正常化することが治療で大切であることが示された。また論文には、臨床では抗生剤を長期塗布する治療法は現実的ではなく、抗生物質に頼らない正常な細菌叢を誘導する方法の検討が大切であると述べられている。

(3) アルミニウム液の抗菌活性：ブロー氏液について

ブロー氏液は、19世紀後半にドイツの医師 Karl August von Burow により収斂・消毒剤と

して考案された pH 約 3 の 13%酢酸アルミニウム溶液である。タンパク質に接すると「タンパクー金属複合体」を形成し、殺菌、肉芽形成促進などの作用を発現させる。欧米では現在も医療に使用されているが、日本では 1920 年発行の薬局方にまでは収載されていたが、抗生物質の普及とともに使用頻度が減少し、1971 年に削除された。しかしながら 2000 年に発表された Thorp らの論文によると、慢性可能性中耳炎患者に非常に有効であるということから、日本でも耳鼻科領域において抗菌性の高さと同様に耐性菌の問題から、再び脚光をあび始めている⁸⁾。ブロー氏液は、ミョウバンと同様にアルミニウムの溶液であり、細菌、真菌の種類を選ばず MRSA や緑膿菌にも有効であるというスペクトルの広い抗菌作用を有し、さらに現存する抗生物質とは作用機序も異なっており、副作用の報告もほとんど無い。よって本研究では、上述の (2) の内容と絡めて、「湯の花」が黄色ブドウ球菌に対して抗菌作用を発することで、アトピー症状を改善するのではないかと推測し、その可能性を探ることを目指した。

2. 研究内容

【研究方法】

(1) 「湯の花」使用者のモニタリング調査

ミョウバンは民間療法として以前よりアトピー性皮膚炎などの皮膚炎症性疾患の症状緩和に利用されている。そこで申請者らは、2016 年 4 月～8 月まで、別府岡本屋旅館において、皮膚トラブルに対する民間療法として「湯の花」を購入しに来た 8 名の方々に、「湯の花」使用前後の症状の経過観察を行った。内訳はアトピー性皮膚炎と診断されている方が 4 名、座瘡の方が 2 名、酒さ様皮膚炎と診断された方が 1 名、基底細胞癌 (90 歳のため手術はせず経過観察中) と診断された方が 1 名であった。

(2) 「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

「湯の花」がアトピー性皮膚炎の症状緩和に有効であったのは、「湯の花」が黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示したためと私達は考えた。そこで「湯の花」が黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示すのか、*in vitro* で検討を行った。「湯の花」を濃度依存的に添加した黄色ブドウ球菌液(10^6)を作製し、作製直後と 25°C 1 時間保持後の菌液を、卵黄加マンニット食塩寒天培地で 37°C、48±2 時間培養し、それぞれの菌数を計測した (図 6)。

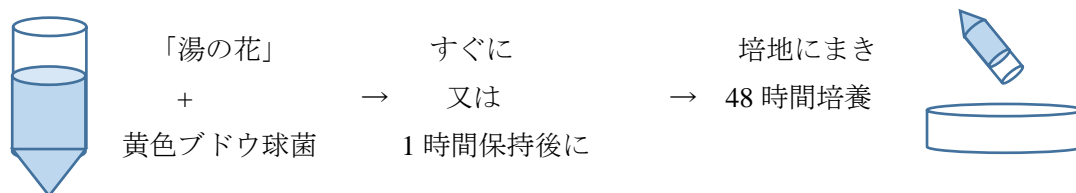


図 6. 黄色ブドウ球菌に対する「湯の花」の抗菌活性試験

(3) 「湯の花」の免疫活性機能の探索

免疫を司るヘルパーT細胞には、体液性免疫を導くサイトカインを産生するTh2細胞と、細胞性免疫を導くサイトカインを産生するTh1細胞とがある。Th1とTh2はシーソーのような関係で、生体内で片方が上昇すれば片方が下降するという関係にある。アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギーはTh2が優位になっている状態で、炎症を抑える為には、アレルギー除去だけでなくTh1/Th2バランスを整えることも重要であると考えられる。そこで私達は、「湯の花」の刺激がTh1/Th2バランスに影響を与えているのか調べるために、樹状細胞を用いて、「湯の花」の免疫活性機能の探索を行った。

骨髄系樹状細胞を $6 \times 10^6/5\text{ml/well}$ の濃度で6wellプレートに播種し、GM-CSF加RPMI培地を用いて24時間培養を行った。24時間後に「湯の花」DMSO溶解液を、最終濃度 $50\mu\text{g/well}$ となるように添加して、さらに48時間培養を行った。48時間後に樹状細胞を回収し、RNA抽出を行い、変動する遺伝子の網羅的解析を行った。

(4) 「湯の花」の皮膚細胞への影響と皮膚浸透性

上記(1)～(3)の結果より、「湯の花」には①黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性、②Irak4を介した黄色ブドウ球菌に対する抵抗性の向上、③Th1系の活性化によるTh2系の抑制、という効果がある可能性を見出した。そこで「湯の花」の溶解した温泉に入ることで、本当に皮膚を介して3つの効果を引き出せるのかどうかを調べるために、「湯の花」の皮膚細胞への影響と皮膚透過性の実験を*in vitro*にて行った。

ニコダームリサーチ社の三次元組織ヒト表皮モデルを用いて実験を行った。ヒトケラチノサイトを12穴プレートに添加し、3次元培養表皮モデルEpiSkin-LM(EpiSkin)を設置した。角化過程を経て、角層機能を持つ再生表皮を形成させた。その後、「湯の花」のDMSO溶解液を $25\mu\text{g/well}$ となるように添加し、48時間培養を行った。48時間後に、細胞は組織染色を行って状態を観察し、培地はICP-MS/MS解析することにより、「湯の花」成分が皮膚細胞と基底層を通過して溶液中に出ているのか検討を行った(図7)。

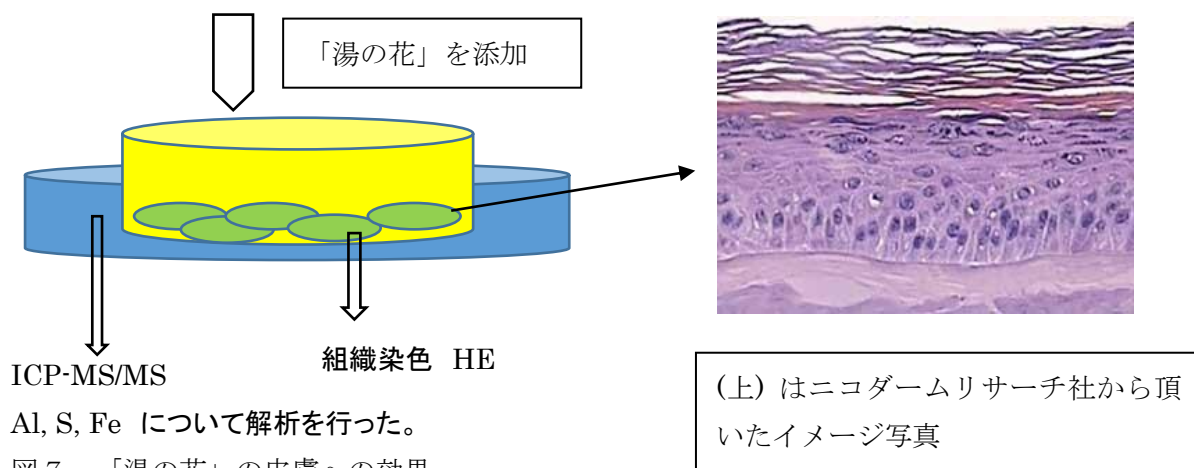


図7. 「湯の花」の皮膚への効果

組織染色方法

EpiSkin の表面を PBS(-)にて洗浄し、4%パラホルムアルデヒドに一晩浸漬し固定を行った。次に、パラフィンブロックを作成後、ミクロトームにて 5 μm の厚さで薄切して切片をスライドガラスに貼り付けた (組織切片の作成)。染色後の組織切片をマリノール封入し、顕微鏡画像を撮影した。以下、染色手順について記す。スライドガラスに張り付けた組織切片をマイヤーのヘマトキシリン溶液に 10 分間処理し、精製水にて洗浄した。次いで、0.5% エオシン Y を含有した PBS(-)にて 5 分間処理し、精製水にて洗浄した (HE 染色)。

【結果・考察】

(1) 「湯の花」使用者のモニタリング調査 (以下は全て特許で既に公開されています)

「湯の花」使用者 8 名に対してモニタリング調査を行った。その結果 8 名とも皮膚症状の改善傾向を認めた。基底細胞癌と診断されていた女性は、「湯の花」継続使用 2 週間後、一部が痂皮化、落屑し、正常組織に戻るといった経緯も認めた。3 名の写真を以下に示す。

【写真 1】は 2 歳 10 ヶ月の男の子でアトピー性皮膚炎と診断されていた。「湯の花」継続使用 35 日で、ほぼアトピーの症状は消失した。



「湯の花」使用前



「湯の花」使用 35 日目 【写真 1】

【写真 2】は幼少期から重篤なアトピー症状が続いている 30 歳男性の肘写真である。様々な処方薬を使用してきたが、結局コントロールできずに現在に至った経緯がある。「湯の花」を継続使用することで改善傾向を認めた。



「湯の花」使用前



「湯の花」使用 9 日目



「湯の花」使用 33 日目 【写真 2】

【写真3】は17歳の女性の写真で、小学生の時にアトピー性皮膚炎を発症した例である。掻痒感が激しく、「湯の花」使用後に掻痒感が消失するとともに、発疹にも改善傾向が認められた。



「湯の花」使用前

「湯の花」使用8日目

「湯の花」使用47日目

【写真3】

これらのモニタリング調査により、別府「湯の花」にはアトピー性皮膚炎に対して何らかの有効成分が含まれているのではないかと推測できた。今回は医療機関で臨床試験として調査を行った訳ではないので、1人1人の詳細な経緯やコントロールデータなどは調査できていないが、私達は8名の方の「湯の花」使用前後の症状を調べることで、研究の方向性を決めることができたと考えている。

(2) 「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

コントロールでは1時間の保持に関わらず、測定48時間後の黄色ブドウ球菌数には変化が認められなかった。また「湯の花」と混合させてすぐに培地に移した群にはあまり菌数の変化が認められなかったのに対し、「湯の花」と混合させて1時間保持した後に培地に移した菌群では、「湯の花」の濃度依存的に、測定菌数の減少を認めた(表2)。

	すぐに培地にまいた 場合 (CFU/ml)	25°C1 時間保持後に培地に まいた場合 (CFU/ml)
滅菌精製水 (コントロール)	2.8×10^4	2.4×10^4
「湯の花」 2.0g/100ml	1.4×10^4	0
「湯の花」 1.0g/100ml	1.3×10^4	7.6×10^3
「湯の花」 0.5g/100ml	1.6×10^4	8.4×10^2
「湯の花」 0.1g/100ml	2.2×10^4	1.0×10^3

表2. 「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性試験結果

以上の結果より、①「湯の花」は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有する、②その抗菌

作用は「湯の花」と長時間混合させることにより発現することから、研究背景で記述したブロー氏液と同様に「金属—タンパク複合体形成」によるものではないかと推測できた。

(3) 「湯の花」の免疫活性機能の探索

In vitro において、「湯の花」を樹状細胞に添加し、樹状細胞の遺伝子を網羅的に解析することで、「湯の花」が、どのような免疫機能に影響を与えているのか検討した。

表3は15倍以上の差を認めた遺伝子を示している。特に **Irak-4** 遺伝子の発現は142倍と群を抜いて高かった。**IRAK-4** は **Interleukin-1 receptor associated kinase 4** であり、2002年に同定された分子である。**IRAK-4** が欠損すると、**IL-1R**、**IL-18R** 刺激、**TLR2,3,4,9** 刺激に対する反応が欠損し、ブドウ球菌に対する感染抵抗性が著しく低下することが既に報告されている。**TLR2,3,4,9** 刺激は基本的に **Th1** を優位に導く経路であるため、「湯の花」は **Th2** に傾いているアレルギー症状を **Th1** へ傾けている可能性が示唆された。つまり「湯の花」には、①アトピー性皮膚炎の主要原因である黄色ブドウ球菌に対する生体側の抵抗性を向上させる、②**Th2** に傾いている免疫バランスを **Th1** に傾ける、という効果があると考えられる。

GeneName	FoldChange
Irak4	142.5574415
Gdap1	27.41435832
Defb42	26.35255063
Slit2	23.70448591
AK131781	20.12829826
5730457N03Rik	19.69499301
Saxo1os	19.62609305
chr1:93755492-93755943_R	19.08248299
Nr2e3	16.47537274
Cpxm2	16.26775203
Myh3	16.17723344
C230037E05Rik	15.71060464
Mpp6	15.39805261
Wdhd1	15.33276521
Krt36	15.31954772

表3. 「湯の花」の樹状細胞に対する遺伝子発現

(4) 「湯の花」の皮膚細胞への影響と皮膚浸透性

DMSO 適用後の皮膚モデルと比較して、「湯の花」(サンプル HU) の角層および表皮層の厚みは薄かった。また DMSO 適用後と比較して、角層では下部が膨潤し、表皮層の厚みが薄くなった (図 8)。

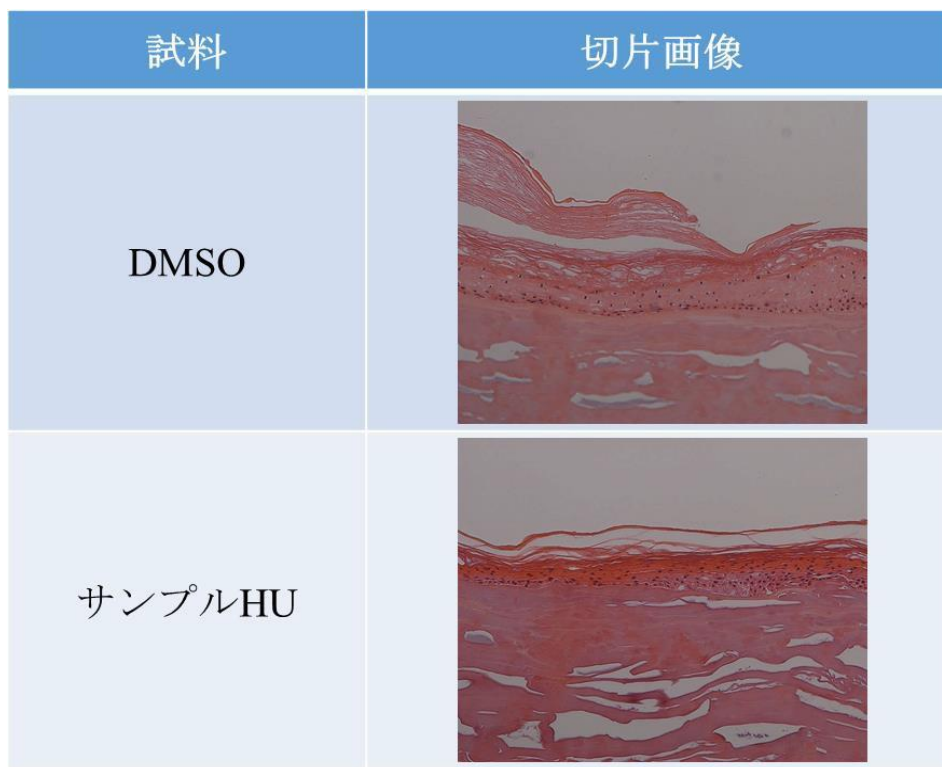


図 8. 「湯の花」の皮膚に対する効果 ; HE 染色

ICP-MS/MS 解析では、溶液中のアルミニウム、硫黄、鉄について調べた。アルミニウムと鉄において、皮膚基底層を通過して真皮層まで浸透している可能性が示唆された (図 9)。

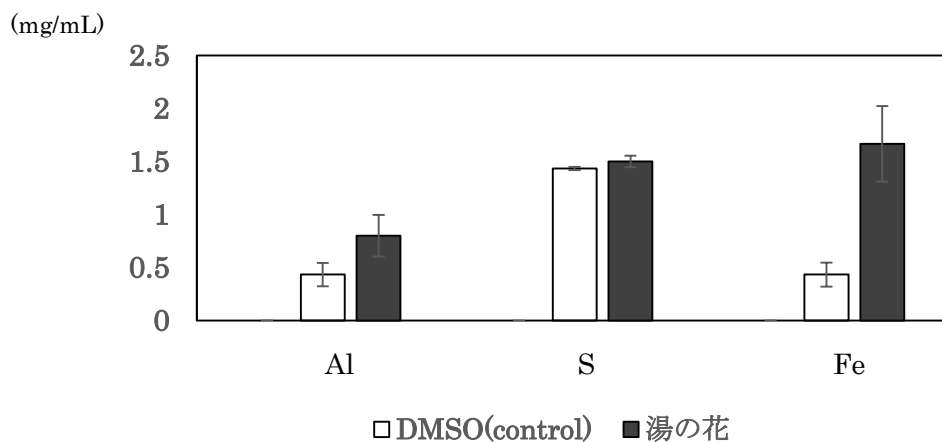


図 9. ICP-MS/MS 結果

3. 研究成果の副次的効果

(1) 皮膚疾患に対する治療選択肢を増やすことができる

H26の厚労省の報告によれば、アトピー性皮膚炎の患者数は約46万人存在し、その数は年々増加している。現在、皮膚の炎症には「ステロイド薬」「プロトピック」などが使用されており、また開発中のものとして「IL-4Ra抗体」「IL-31R抗体」がある。いずれも掻痒感や炎症に対して効果があるが、菌交代現象や日和見感染症などの副作用が生じるケースも多く、自己判断で治療を辞めてしまう人も多い。アトピー性皮膚炎の主原因が黄色ブドウ球菌であると報告されたことから、ターゲットを細菌にした新しい治療薬の開発は急務である。特に長期抗生物質の使用が現実的でないことから、漢方薬やハーブなどを利用した黄色ブドウ球菌コントロール薬が求められる。ミョウバンは決して新しい物質ではないが、モニタリング調査、耳鼻科領域での温故知新、インフラマソーム活性化、IRAK-4分子発現などから考慮すると、抗菌作用を併せ持つ免疫誘導物質であると推測できる。よってミョウバンの作用や作用発現メカニズムを解明することは、皮膚疾患に対する治療選択肢を広げることにつながると考えている。

(2) 「湯の花」を使った感染防御に有効な石鹼や含嗽剤などの開発

昨今、医療現場では「抗生物質耐性菌による院内感染」の問題が深刻になりつつある。1961年にMRSAが出現して以来、現在では、MDR、VRE、VRSAもあり、欧米では年間2万人の患者がこれら耐性菌で亡くなっている。院内感染は医療従事者の手指や飛沫を介して微生物が患者に移行するケースが多い。よって医療従事者の手指消毒・嗽による確実な感染防御体制の確立は急務である。もし「湯の花」がMRSAや多剤耐性緑膿菌に対して有効であるならば、それは新規な知見であり、石鹼液や手洗い液として使用することで、院内感染を劇的に制御できるかもしれない。またインフルエンザなどのウイルスに有効であれば、含嗽剤やスプレー剤として使用し、市中での大流行を弱めることができるとも考えられる。そしてその作用メカニズムは既存の抗生物質や抗ウイルス薬とは異なることが想定できるので、併用することも可能であろうと考えている。

(3) IRAK-4発現増減の意義

2006年に理研よりIRAK-4分子が自然免疫と獲得免疫の両者に共通した分子であることが発表された。しかしながら、IRAK-4分子の定常発現量の差が、感染防御や免疫疾患にどのように関与しているのか報告は少ない。よって本研究を発展させることで、感染防御や免疫疾患に関するIRAK-4分子の新規知見を得ることができる。

今後の計画など

今後は、これまでの研究の再現性をとりつつ、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、「湯の花」が黄色ブドウ球菌をコントロールできるのか検討を行う。さらに、他の細菌やウ

イルスを用いて、「湯の花」に抗微生物活性があるのか検討を行い、そのメカニズムが「タンパク-金属複合体形成」によるものであることを証明する。

また高齢マウスなどを用いて、正常ではあるけれど免疫力が低下している場合、「湯の花」を用いて IRAK-4 分子を発現させることで、日和見的な感染症を予防できるのかどうか検討を行う。「湯の花」入浴剤を使用すると、免疫力が向上し、健康寿命が延長できれば、学術面だけでなく地域の活性化にも繋がる。

4. 研究成果

a) 原著論文

1. Effects of Fermented Barly Extract on Antioxidant Status in JAWS II cells.

SENBA, K., WU Xianglin, MARUOKA. N, HOKAZONO. H, IKEBE. Emi, YONEMOTO.T.

Bulletin of Beppu University Graduate School No.18 p89-93 2016 (査読有)

b) 総説

なし

C) 招待講演、シンポジウムなど

1. 2015年9月1日 産学官交流大会講演

「別府地獄蒸し料理は加齢マウスの記憶力を増加させる」

d) 国際学会

なし

e) 国内学会

1. サイエンス・インカレ 2018

「別府湯の花の皮膚に対する効果」(研究室の学生が発表)

f) 特許

1. 湯の花が溶解された溶液、それを用いた感染症予防液 (出願番号:特願 2017-24738)

出願日 2017年2月27日

出願人: 学校法人別府大学

発明者: 仙波和代

g) その他(学会賞、報道など)

1. 2017年7月13日 OBS ラジオ

湯の花の効能について

2. 2018年サイエンス・インカレ ファーウェー賞受賞
湯の花の皮膚に対する効果
3. 2018年3月22日 今日新聞
別府大学の湯の花の研究について
4. 2018年3月24日 大分合同新聞
別府大学の湯の花の研究について