

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 石田 萌子
Name

学位論文題目： ホウレンソウ水溶性成分の機能性に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

[序論]

食品には、様々な栄養成分が豊富に含まれており、生体に多様な作用を与えている。食品の機能は3つに分類されている。1次機能は、生きていくうえで必要な栄養分の供給機能である。生命の維持には、タンパク質、糖質、脂質、ミネラル類、ビタミン類の5大栄養素の摂取が必要不可欠であり、栄養素の摂取バランスが崩れると健康を害することに繋がる。2次機能は、嗜好性、あるいは感覚機能と呼ばれる、ヒトの感覚に対する機能である。食品は薬と異なり、有効な栄養素が豊富であったとしても、見栄えや味、匂いなどが悪ければ受け入れられない。そこで、食品の受諾性の決定づけに、この2次機能が重要な役割を果たしている。そして、3次機能は、ヒトの健康の維持や増進に役立つ生体調節機能であり、近年の健康志向の高まりにより注目が集まっている。

食品の機能性表示に関して、これまでは特定保健用食品と栄養機能食品として認められた食品のみ、機能性を表示することができた。しかし、栄養機能食品は対象成分が限定されていること、特定保健用食品は許可手続きに時間と莫大な費用がかかることから、実際には中小企業をはじめとする多くの企業が自社の健康食品の効果を明示することができなかった。特に、サプリメントや健康食品において、これまでの制度では「何に効果があるのか表記されていない」、「あいまいな表現でわかりにくい」などといった課題があった。そこで、平成27年4月から、機能性表示食品制度が新たに導入され、安全性や機能性について一定の条件が満たされれば、企業や生産者の責任で食品の機能性を表示できるようになった。これらの制度により、食品の3次機能に着目した機能性食品の開発が以前よりも活発化しており、身近にある食品成分由来の保健機能に関する研究が多数報告されている。機能性食品は、毎日の食事から摂取するだけで食品の3次機能を得られるだけでなく、治療薬の代替品としての可能性にも注目されている。食品由来成分を用いることは、従来の薬剤に比べて副作用が少なく、安全性が高いこと、そして恒常的に摂取可能という観点からも未病者のQOL向上に貢献できるとして期待されている。

緑黄色野菜の1つであるホウレンソウは、主に、千葉県や埼玉県、群馬県で栽培されており、日本は世界第3位の主要生産国となっている。ホウレンソウには、カロテンやビタミン類、葉酸などの栄養素が豊富に含まれており、これら成分によるアンチエイジング、抗酸化、抗炎症作用などの多様な保健機能が報告されている。多くの研究がルテインなどのカロテノイドや糖脂質といった、脂溶性成分に集中しており、ホウレンソウ水溶性成分による保健機能の報告は極めて少ないのが現状である。そこで、新規の機能性成分に関する知見を得ることを目的として、ホウレンソウ水溶性成分の抗アレルギー効果、および免疫賦活効果に着目して研究を行った。

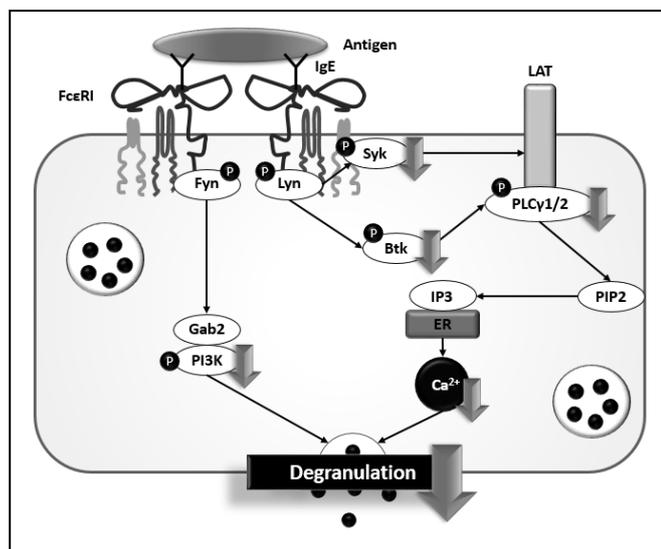
[ホウレンソウ水溶性抽出物の抗アレルギー効果]

アレルギーとは、異物を排除するために働く生体防御機構である免疫反応が、食品などの無害な物質に対して過剰に反応することをいう。アレルギーは主に4つの型に分類され、その中でも花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどの症状が挙げられるI型アレルギーは、近年患者数が増加している。花粉症に着目すると、現在、日本国内での花粉症患者数は人口の約30%が罹患していると思われており、今や国民病と言っても過言ではない状況である。また、花粉症の場合、一度罹患すると完全治癒は難しいと言われている。現在、舌下減感作療法などの治療法があるものの、治療に時間がかかるなど、その効果は今のところ限定的であるため、今後、患者数はますます増加すると考えられる。さらに、PM_{2.5}や黄砂との相乗的な増悪作用が取り沙汰されており、可及的速やかな対策が求められている。I型アレルギー症状の緩和には、抗ヒスタミン剤などの抗アレルギー薬の服用が一般的であるが、眠気や口渇などの副作用を生じることがあり、リスクが大きいことが欠点として挙げられる。そこで、近年、従来の薬剤に比べて副作用の心配がなく安全性の高い食品由来成分による、抗アレルギー効果が注目されている。

I型アレルギーは即時型アレルギーとも呼ばれ、白血球の一種であるマスト細胞や好塩基球と免疫グロブリンE (IgE) が反応することで引き起こされる。体内にスギ花粉などの抗原物質 (アレルゲン) が侵入すると、マクロファージなどの抗原提示細胞からの抗原提示を受け、抗体産生細胞からその抗原に対するIgE抗体が産生される。産生されたIgEは、肥満細胞や好塩基球の細胞表面上に存在する高親和性IgE受容体 (FcεRI) に結合する。再度、同じ抗原物質が体内に侵入すると、これらの細胞表面上のIgEと架橋結合することでシグナル伝達を開始され、細胞内へのカルシウムイオン (Ca²⁺) 流入により細胞内Ca²⁺濃度が上昇することで、細胞内顆粒からアレルギー症状を引き起こすヒスタミンなどが放出される。この過程は脱顆粒と呼ばれ、放出されたヒスタミンは血管の拡張と血管壁の透過性を亢進させ、即時型アレルギー反応を引き起こす。従って、アレルギー症状の緩和には、肥満細胞や好塩基球による脱顆粒を抑制することが重要となる。そこで、脱顆粒に対するホウレンソウ水溶性成分の抑制効果を、ラット好塩基球細胞株RBL-2H3細胞を用いて検討した。ホウレンソウ凍結乾燥粉末を10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (NaPB) に懸濁して4℃で24時間攪拌することで成分を抽出し、これを遠心して回収した上清をホウレンソウ水溶性抽出物 (SAE) として用いた。抗ジニトロフェニル (DNP) -IgEで感作したRBL-2H3細胞にSAEを作用させた後、DNP-ヒト血清アルブミン (HSA) で

抗原刺激することにより脱顆粒を誘導した。その結果、SAEはRBL-2H3細胞の生存に影響することなく脱顆粒を有意に抑制した。このことから、SAEは肥満細胞や好塩基球の脱顆粒を抑制する抗アレルギー効果を有することが明らかになった。SAEに含まれる活性物質は、分子量8,000以上14,000以下の比較的熱に安定な、非タンパク質性物質であることが推察された。また、逆相クロマトグラフィーによる分画の結果、極性の高い画分に認められる2つのピーク成分が活性物質ではないかと推察された。

続いて、SAEが脱顆粒を抑制する作用機序の解析を行った。まず、細胞内Ca²⁺濃度の上昇に及ぼすSAEの影響をCa²⁺の蛍光プローブであるFluo 3を用いて検討した結果、SAEの作用により細胞内Ca²⁺濃度の上昇が抑制された。続いて、細胞内シグナル分子に対するSAEの影響を免疫ブロット法を用いて検討した結果、脱顆粒シグナル伝達経路の上流に位置するSyk、およびPI3Kのリン酸化を下方制御することで、細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑制し、脱顆粒を抑制することが示唆された。



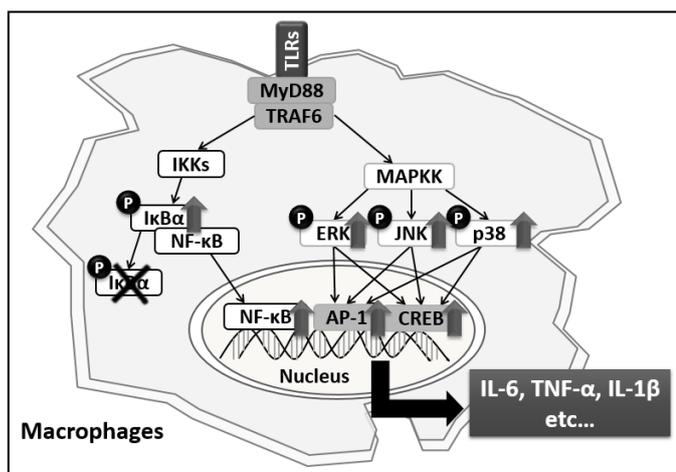
脱顆粒によりヒスタミンが放出されると、血管透過性が亢進し、血液成分が血管外へと漏出する。そこで、DNP-IgEで感作したマウスに、色素成分を含むDNP-HSA溶液で抗原暴露することで、受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応を誘導し、血管透過性亢進により漏出した色素成分を指標として生体内での脱顆粒に対する効果を検討した。その結果、SAEの投与によりPCA反応が有意に抑制され、SAEが生体内での脱顆粒に対しても抑制効果を示すことが明らかになった。また、スギ花粉の精製アレルギーであるCry j1をマウス鼻腔内に投与することでスギ花粉症を誘発し、スギ花粉症に対するSAEの効果を検討した。その結果、SAEの投与により花粉症症状の一つであるくしゃみの回数が軽減された。これらの結果から、ハウレンソウ水溶性成分はヒトにおいても花粉症などに対する抗アレルギー効果を示す可能性が示唆された。

[ハウレンソウ水溶性抽出物の免疫賦活効果]

免疫とは、生体内において病原体などの非自己物質、および損傷した細胞やがん細胞などの異常な細胞を認識して殺傷することで、生体を病気から保護する機構である。ヒトの健康維持において免疫系は必要不可欠であり、免疫系が機能しない場合、健康な人ならほとんど問題にならないような感染症でも死に至る原因となる。免疫系は自然免疫応答と獲得免疫応答に分かれており、ほとんどの感染は自然免疫応答により阻止される。しかし、感染が自然免疫応答を突破した際には、より柔軟で強力に対応することができる獲得免疫応答が機能する。高齢になると、免疫力が低下し、感染症に対する抵抗力が低下する。そのため、高度高齢化社会を迎えた日本において、免疫機能の維

持、および賦活化する機能性食品の開発は重要なテーマとなっている。そこで、免疫系において最初の防御機構である自然免疫応答において重要な役割を担っているマクロファージに対する賦活効果に着目して研究を行った。

マクロファージは単球から分化した食細胞であり、自然免疫応答において主に2つの重要な役割を担っている。まず、細胞表面上の様々な受容体により侵入微生物を認識すると、サイトカインやケモカインなどのリンパ球を活性化する因子を産生する。また、侵入微生物を貪食して細胞内で分解し、その微生物断片を抗原として細胞外に提示する抗原提示の役割も果たしている。この活性化因子や抗原提示により、B細胞やT細胞などのリンパ球を中心とした獲得免疫応答が活性化されるため、マクロファージの活性化は免疫系全体の機能強化に繋がると期待できる。本研究では、SAEを分画分子量14,000の透析膜で透析したものを透析SAE (D-SAE) として用いた。D-SAEを添加した培地でマウスマクロファージ様細胞株J774.1細胞、およびマウス腹腔内マクロファージ (P-Mac) を培養し、IL-6、およびTNF- α 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、J774.1細胞、およびP-Macの両方において、サイトカイン産生の促進が認められた。リアルタイムRT-PCRの結果から、D-SAEは遺伝子の転写活性を促進してサイトカイン産生を活性化することが示唆された。また、D-SAEはマクロファージの貪食活性も促進することが確認された。D-SAEがマクロファージを活性化する作用機序を解析した結果、D-SAEは、マクロファージ表面受容体であるTLR4の下流に存在するMAPK、およびNF- κ Bカスケードを上方制御することで、マクロファージを活性化することが明らかになった。またD-SAEは、TLR4以外の受容体にも関与し、活性化していることが示唆された。D-SAEに含まれる活性物質について検討した結果、活性物質は分子量14,000以上の熱に不安定な、タンパク質であることが推察された。



最後に、D-SAEの生体内における効果を検討した。D-SAEを14日間経口投与したマウスからP-Macを回収し、培養上清中のサイトカイン産生量を測定することで*Ex vivo*実験を行った。その結果、マウスへのD-SAEの経口投与により、P-MacのIL-6産生が有意に促進された。このことから、D-SAEは生体内においてもマクロファージ活性化を示す可能性が示唆され、ハウレンソウ水溶性成分はヒトにおいても免疫賦活効果を示す可能性が推察された。

[総括]

本研究により、ハウレンソウ水溶性抽出物には、抗アレルギー効果を示す物質、および免疫賦活効果を示す物質が含まれていることが明らかになった。その活性物質はそれぞれ異なっており、抗アレルギー効果を示す物質は分子量8,000以上14,000以下の熱に安定な非タンパク質性物質であり、

(様式5) (Style5)

一方、免疫賦活効果を示す物質は分子量14,000以上のタンパク質であることが示唆された。これらの結果から、ハウレンソウ水溶性抽出物には花粉症などに対する抗アレルギー効果に加え、感染症などに対する免疫活性の増強に貢献する新規性の高い成分が含まれることが明らかになった。今後、活性物質の同定が必要であると考えられる。

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations