

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	石田 萌子
審査委員	主査 菅原 卓也 副査 山内 聡 副査 西 甲介 副査 受田 浩之 副査 田村 啓敏

### 論文名

ホウレンソウ水溶性成分の機能性に関する研究

### 審査結果の要旨

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、これらの成分による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、水溶性成分の保健機能に関する報告は極めて少ないのが現状である。そこで、ホウレンソウの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、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に取り組んだ。

まず、アレルギー発症において重要なプロセスである、肥満細胞や好塩基球の脱顆粒に対する効果を検討した。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 で感作したラット好塩基球細胞株 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だと推察された。続いて、SAE の脱顆粒抑制効果の作用機序の解析を行った結果、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、RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制することが示唆された。さらに、受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルマウス、およびスギ花粉症モデルマウスに対する SAE の経口投与により、アレルギー症状の緩和効果が認められた。これらのことから、SAE は生体内においても抗アレルギー効果を示すことが明らかになり、ホウレンソウ水溶性成分がヒトにおいても抗アレルギー効果を示す可能性が推察された。

続いて、自然免疫応答において重要な役割を担うマクロファージに対する賦活効果について検討した。この検討では、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- $\alpha$  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 は遺伝子発現を活性化してサイトカイン産生を促進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、マクロファージの細胞膜表面受容体である TLR4 の下流に存在する MAPK、および NF- $\kappa$ 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、タンパク質性物質であることが推察された。さらに D-SAE は、経口投与によってマウス体内においてもマクロファージを活性化することが明らかになった。これらの結果から、ホウレンソウ水溶性成分はヒトにおいてもマクロファージに対する賦活効果を示すのではないかと推察された。

本研究により、ホ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を明らかにした。また、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、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を示唆する結果を得た。本研究により、ホ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を明らかになり、ホウレンソウの新たな健康機能を示すことができた。本研究成果は、ホウレンソウを活用した機能性食品開発に向けた重要な知見を与えるものであると高く評価できる。

本論文の公開審査会は、平成 29 年 2 月 4 日に愛媛大学農学部において開催され、申請者による口頭発表と質疑応答が行われた。引き続き、学位審査委員会を開催して論文の内容について慎重に審査した結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。