

# New Food Industry

2021

7

*New food indust. 63 (7): 2021.*

## 原著

- ◆ トウガラシ摂取後の口腔内の痛み・違和感に対するブルーベリーによる軽減効果

## 解説

- ◆ クマ笹葉アルカリ抽出液(ササヘルス<sup>®</sup>)の抗炎症作用のマルチオミックス分析

## 総説

- ◆ ビタミンA誘導体による時計遺伝子・血糖調節遺伝子の発現制御

## 連載解説

- ◆ グルテン-沈殿要因-2

## コーヒー博士のワールドニュース

- ◆ コーヒーの香りが変だと思ったらニコチン酸を飲みなさい

# New Food Industry Editorial Board

## ■ボードメンバー敬称略(五十音順)

大石 隆介	Ryusuke Oishi	明海大学 経済学部経済学科
岡 希太郎	Kitaro Oka	東京薬科大学
具 然和	Yeunhwa Gu	純真学園大学 放射線技術科学科
古賀 邦正	Kunimasa Koga	(一財)自然環境研究センター
齋藤 忠夫	Tadao Saito	東北大学
坂上 宏	Hiroshi Sakagami	明海大学 歯科医学総合研究所(M-RIO)
史 海霞	Haixia Shi	上海交通大学 医学院第九人民医院
白瀧 義明	Yoshiaki Shirataki	城西大学 薬学部生薬学講座
須見 洋行	Hiroyuki Sumi	倉敷芸術科学大学
瀬口 正晴	Masaharu Seguchi	神戸女子大学, 日本穀物科学研究会会長
早田 邦康	Kuniyasu Soda	医療法人財団 聖蹟会 埼玉県中央病院 院長
津田 孝範	Takanori Tsuda	中部大学 応用生物学部食品栄養科学科
友村 美根子	Mineko Tomomura	明海大学 総合教育センター
日比野 康英	Yauhide Hibino	城西大学大学院 薬学研究科
豊崎 俊幸	Toyosaki Toshiyuki	香蘭女子短期大学 食物栄養学科
牧 純	Jun Maki	松山大学薬学部 医療薬学科
増田 宜子	Yoshiko Masuda	松本歯科大学 歯科保存学講座
松郷 誠一	Seiichi Matsugo	金沢大学
宮尾 茂雄	Shigeo Miyao	東京家政大学 大学院
山口 正義	Masayoshi Yamaguchi	University of Hawaii Cancer Center
山田 正子	Masako Yamada	東京家政学院大学 現代生活学部 食物学科
肖 黎	Li Xiao	日本歯科大学 生命歯学部薬理学講座
渡部 保夫	Yasuo Watanabe	愛媛大学 大学院



自然の恵みを運ぶ  
丸善製薬株式会社

食品営業部

【東京】東京食品課 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2-6-7 TEL(03)3496-1521 FAX(03)3496-1641

【大阪】大阪食品課 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町2-6-6(塩野日生ビル6F) TEL(06)6203-6918 FAX(06)6233-3606

<http://www.maruzenpcy.co.jp>

# ミルク

至高の食品がわかる

伊藤 敏敏 著

■A5版 / 156ページ

■定価：2090円（本体1900円）

■発行：エヌエフアイ



## 第1章 ミルクの科学的特性 一秘められた力

1. ミルクは食糧として作り出される唯一の天然物
2. 牛乳、母乳その他の動物の乳はどのように違うのだろうか
3. 乳はなぜ白いのだろうか
4. 乳の成分の特性とそのパワー
5. 牛乳の構成成分のまとめ
6. 牛乳のアレルギー性
7. 乳児用調製粉乳はどこまで母乳の代用になるか
8. 牛乳に人の免疫力を付けられるか
9. 特定保健用食品（機能性食品）は乳の研究から生まれた
10. 牛乳はどのようにして作られるか（餌が牛乳にかわるまで）
11. 牛乳成分の含量はいつも同じなのだろうか

## 第2章 乳製品の知識と製造の基本原則

1. 日本ではどの位の牛乳・乳製品が食べられているのだろうか
2. 農家で搾った牛乳が工場に入るまで
3. 牛乳・乳製品の分類と規格
4. 牛乳の加熱殺菌について
5. 牛乳の均質化処理（ホモジナイズ処理）
6. 発酵乳と乳酸菌
7. チーズ
8. バター
9. アイスクリーム
10. 濃縮乳（練乳、コンデンスミルク、エバミルク）
11. 粉乳

■著者 / 伊藤 敏敏 (いとう たかとし)

◆農学博士

1937年愛媛県生まれ。東北大学大学院農学研究科修士課程修了後、1962年株式会社ニチレイ入社。1963年東北大学農学部助手。

1976年同大学助教授。1989年同大学農学部教授を経て2001年日本大学生物資源科学部教授。東北大学名誉教授。

◆ご注文は FAX またはメールにて FAX:042-312-0845 info@nfi-llc.co.jp

### 原著

- トウガラシ摂取後の口腔内の痛み・違和感に対するブルーベリーによる軽減効果

岩田 健吾, 杉山 立志 487

### 解説

- クマ笹葉アルカリ抽出液 (ササヘルス®) の抗炎症作用のマルチオミックス分析

坂上 宏, 中谷 祥恵, 榎本 文芽, 太田 紗菜, 金子 未来, 杉本 昌弘, 堀内 美咲, 戸枝 一喜, 大泉 高明 494

### 総説

- ビタミン A 誘導体による時計遺伝子・血糖調節遺伝子の発現制御

三崎 紀展, 林 桃子, 高木 勝広, 山田 一哉 501

### 母乳の力

- 母乳の基礎知識

大谷 元 509

## プラントベースフードの課題を食品素材で劇的に改善!!

大豆たんぱくの味・臭いが残り、美味しくない

改善①

「さとうきび抽出物」の添加で、大豆の青臭さや、嫌な後味が改善され、味のバランスがまとまります。



※「さとうきび抽出物」、「竹食物繊維」は三井製糖株式会社の製品です。詳しい内容はオンラインベースへ

食べ応えのある食感が再現できない

改善②

「竹食物繊維」の添加で、本物の肉に近いワイルドな食感を実現できます。また歩留まり向上も図れます。

	無添加	改良品
加熱後の重量減少率	2.90%	1.77%

また、食肉用酵素製剤もおすすめです。

見た目が淡白で、食欲がそそられない

改善③

「カロブパウダー」は焙煎度合いに応じた3種類の商品を選べ、好みに合わせた焼き色を再現可能です。



カロブパウダーの詳細内容はこちらへ



無添加

改良品



ミートレスハンバーグ (大豆たんぱく使用)

- さとうきび抽出物 : 100ppm
- 竹食物繊維(BF) : 3.5%
- 食肉用酵素製剤 : 0.5%
- カロブパウダー : 1%

## 連載解説

### ■ グルテン – 沈殿要因-2

瀬口 正晴, 吉野 精一 529

## 連載 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —

### ■ タラノキ *Aralia elata* (Miq.) Seem. (ウコギ科 Araliaceae)

白瀧 義明 536

## 連載 コーヒー博士のワールドニュース

### ■ コーヒーの香りが変だと思ったらニコチン酸を飲みなさい

岡 希太郎 539

## 随想

### ■ 分子生物学を門の前から覗く

兎束 保之 543

## News Release

- ◆安定した環境でカリフォルニア プレミアムプルーンは見通し良好 547
- ◆ハーバード大学研究チーム, 最新テクノロジー 548
- ◆yet2, 小林製薬株式会社のオープンイノベーション公募開始 550
- ◆神奈川歯科大学, 低脂肪摂取時にフラクトオリゴ糖の効果が発揮されることを発見 552

世界から、優れた「自然の恵み」を提供します

## アンデスの母なる穀物 **キヌア**



南米アンデス原産のヒユ科アカザ亜科の雑穀です。インカ帝国の時代より食され、栄養価の高さから伝承的に「母なる穀物」として重用されてきました。食物繊維や鉄・マグネシウムなどのミネラル、すべての必須アミノ酸を含む、栄養バランスに優れたグルテンフリーの雑穀で、スーパーフードとして世界的にも注目されています。

「茹でる」「炊く」が1番ポピュラーな食べ方で、フキフキとした食感を楽しめます。スープ・雑炊・サラダ・雑穀米など様々な料理に使われています。

取扱い製品

◆キヌア粒

◆有機キヌア粒



# 現代チーズ学

編集集

齋藤 忠夫 東北大学大学院農学研究科  
 堂迫 俊一 雪印乳業株式会社技術研究所  
 井越 敬司 東海大学農学部

# The Contemporary Cheese Science

480 ページ超の大迫力！  
 業界第一人者が集結！  
 チーズ研究の必携書

チーズ研究の頭脳集結！  
 熟成した研究成果を、  
 じっくり書き上げた  
 問い合わせ殺到の  
 究極のチーズ技術書！

PDF 版 いよいよ  
 発売!!お問合せは  
 エヌエフアイまで

- B5版／496ページ
- 定価：(本体4,500円+税)
- 発行：エヌエフアイ



## 現代チーズ学 目次

1. チーズの歴史、食文化、分類および生産	
1.1 チーズの起源と歴史	大谷 元
1.2 チーズの食文化	村山 重信
1.3 チーズの分類と名称	村山 重信
1.4 世界のチーズの生産・輸出入と消費	伊藤 晋治
2. チーズの基礎科学	
2.1 乳の成分科学	石田 光晴
2.2 チーズ製造の基本フロー	齋藤 忠夫
2.3 乳酸菌スターターの科学	宮本 拓
2.4 キモシンによる凝乳機構	阿久澤良造
2.5 チーズの熟成機構	井越 敬司
3. チーズの製造技術と衛生管理	
3.1 クリームチーズ	岩附 慧二
3.2 モッツアレラチーズ	橋本 英夫
3.3 カッテージチーズ	久米 仁司
3.4 熟成型チーズ	田中 穂積
3.5 キモシン酵素利用の現状	高見 修平
3.6 プロセスチーズ	川崎 功博
3.7 チーズの包装技術	佐々木敬卓
3.8 チーズ製造の衛生管理	柳平 修一 鈴木 明 花形 吾朗
4. チーズの機能性	
4.1 チーズの微細構造	木村 利昭
4.2 一次機能	根岸 晴夫
4.3 二次機能	井筒 雅
4.4 三次機能	堂迫 俊一
4.5 チーズとホエイに含まれるタンパク質の免疫科学	大谷 元
5. ホエイ成分の高度利用	
5.1 チーズホエイとその成分別調製技術	元島 英雅 野島 一晃
5.2 機能性オリゴ糖	浦島 匡
5.3 機能性ホエイ味噌	六車三治男
6. チーズの諸制度と知的財産権	
6.1 チーズの規格基準と表示規制	石田 洋一
6.2 チーズの知的財産権	工藤 力
7. 近未来のチーズ学	
7.1 チーズ製造技術の変遷と進歩	相澤 茂
7.2 近未来のチーズ製造技術	市橋 信夫
7.3 新しいタイプの機能性チーズの開発	松尾 光郎
7.4 スターター乳酸菌における遺伝子組替え技術の応用	佐藤 英一

お申し込み・お問い合わせは、  
 FAX・お電話・WEBにて

電話：042-312-0836

FAX：042-312-0845

エヌエフアイ合同会社

# トウガラシ摂取後の口腔内の痛み・違和感に 対するブルーベリーによる軽減効果

岩田 健吾 (IWATA Kengo)<sup>1</sup>, 杉山 立志 (SUGIYAMA Ryuji)<sup>1,2\*</sup>

Key Words: 辛味評価, 辛味抑制, ブルーベリー, ポリフェノール

## Blueberries reduce the burning sensation caused by spicy meals containing chili pepper

**Authors:** Kengo Iwata<sup>1</sup>, Ryuji Sugiyama<sup>1,2\*</sup>

**\*Corresponding author:** Ryuji Sugiyama<sup>2</sup>

### Affiliated institutions:

<sup>1</sup> Nagoya Bunri University Department of Health and Nutrition [365 Maeda, Inazawa-city, Inazawa Aichi Pref, 492-8520, Japan]

<sup>2</sup> Current affiliation: Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture, Botanical Garden.

[1737 Funako, Atsugi-shi, Kanagawa, 243-0034, Japan]

Key Words: burning sensation, painkiller, blueberry, polyphenol

### Abstract

When used in appropriate amounts, the hot spicy flavour of chili peppers can enhance the palate of several ingredients. On the other hand, an excessive amount of chili peppers can induce a painful, burning sensation in the mouth. In this study, we searched for novel ingredients that can mitigate spicy food-induced burning sensation on the tongue, by measuring the time they take to mitigate the burning sensation induced by a spicy soup. Participants have swallowed a standard concoction of chicken soup seasoned with chili powder and retained the test food in their mouth for 15 seconds. In the sensory test, the time to resolve the induced burning sensation was compared between the test food and water (control). Food items that are available at many grocery stores (e.g., milk, coffee, biscuit, and honey) were used as test foods. Most test foods have not shown clear effects against the burning sensation. However, blueberries reduced the time to resolve the burning sensation to half that of the result obtained with water. Other food containing polyphenols showed the similar effect as that of blueberries. Some polyphenols reduced spicy food-induced burning sensation. In this study, we found that blueberries are able to mitigate the burning sensation caused by spicy meals containing chili peppers.

### 要旨

食品においてトウガラシの持つ辛味は適量であれば美味しさとなり、トウガラシ無しでは成り立たない料理もある。その一方で、過剰な量のトウガラシを料理に加えると、辛味による口腔内の痛みは食後も継続し苦痛を感じる。痛みの激しい場合、その後の食事もできず、生活に支障を与えることもある。本研究では、トウガラシを含む食品を摂取した後の口腔内のヒリヒリする痛みを軽減する食品素材を探索した。辛味標準食としてトウガラシ粉末を加えた鶏ガラスープを用い、舌で感じるヒリヒリする痛みの消えるまでの時間を測定した。水を摂取した場合のヒリヒリする痛みの消失時間、痛みが消えた後の麻痺したような違和感の消失時間をそれぞれ100として相対的な時間を用いて評価した。試験食品として、牛乳やコーヒーに加えて、ビスケット、蜂蜜など日常的に入手しやすい食品を供試した。多くの食品では、ヒリヒリする痛みの消えるまでの時間に変化はなかった。牛乳、コーヒーで

\* 責任著者: 杉山 立志 (Ryuji Sugiyama)<sup>2</sup> E-mail: rs207428@nodai.ac.jp

<sup>1</sup> 名古屋文理大学 健康生活学部 フードビジネス学科 (〒492-8520 愛知県稲沢市稲沢町前田 365)

<sup>2</sup> 現所属: 東京農業大学 農学部 植物園 (〒243-0034 神奈川県厚木市船子 1737)

もヒリヒリする痛みが消えるまでの時間は、水と比較して変化はなかった。多くの食品の中から、これまで痛み軽減効果の知られていないブルーベリーに口腔内のヒリヒリする痛みを感じる時間を短くする効果のあることを見出した（特許出願中）。ポリフェノールを多く含む食品についても評価を行ったが、ポリフェノール量との痛みの軽減効果の間には明瞭な関係は見られなかった。本研究では、トウガラシを含む食品を食べた後に口腔内のヒリヒリする痛みを軽減する食品としてブルーベリーに効果があることを初めて明らかにした。

## はじめに

トウガラシの辛味は食品の味を構成する一つであり、辛味を感じにくい程度の低濃度でも、味を豊かに感じさせる効果をもつ<sup>1)</sup>。その一方で、自身の許容を超える量を摂取すると、口腔内の痛みは消えず、しばらくの間、食事もできない。痛みが激しいと、食生活以外にも支障を与え、しばらく体調不良になることもある。辛味に限らず、食品を口にする際の問題は、外見では判断できず、口にしなければ味はわからないことである。5基本味に関する味覚では、味を感じる継続時間は食べた瞬間から短時間なので大きな問題とならない。それに対して、辛味の場合、口腔内の痛みは比較的長時間継続する。

辛味に対する耐性には個人差がある。自分自身の許容範囲を超えた辛味を含む食品に対しては、食べないという選択肢がある。その他に、辛味を持つ食材を除いて調理する方法と、辛味を抑制する素材を添加する方法がある。

辛味の苦手な場合、調理するときに、辛味の原因となる食材、特にトウガラシを使用しないこともできる。しかし、個々の料理は、すべての材料の調和によって生まれる「美味しさ」を持っており、その料理の特徴となっている。例えばタイ料理の辛味の強いスープ「トムヤムクン」からトウガラシを抜けば、酸味と塩味の強いスープとなり、本来の美味しさは損なわれる。

トウガラシを除くのではなく、辛味を抑制する方法として、特許には、ジグリセリド<sup>2)</sup>、酸性リン脂質<sup>3)</sup>、酵母<sup>4)</sup>などを添加する方法が見られる。これらの添加目的を見ると「風味付け、防腐、あるいは生理活性効果などの特性が失われることなく辛味を抑制し、その食品を食べ易くすること」<sup>2)</sup>であり、辛味以外の風味や機能を保持することが記載されている。しかし、これらもトウガラシを入れないで調理するのと大きな違いはない。トウガラシの風味を残すのであれば、辛味の無いトウガラシ<sup>5)</sup>を用い

れば良い。

喫食者は必ずしも料理法を要求できる立場にはない。そのため、辛味に対する問題の解決方法は、「食べない」という選択肢しかなかった。料理として辛味を楽しみつつ、食後の口腔内の痛みを軽減できないだろうか。

辛すぎたものを食べた後の口腔内の痛みを軽減する方法は、他の食品を口にして対処することが考えられる。そのような対処方法は、医療における民間療法のように伝承されている。痛みなので、冷たい水を摂取すれば良いと考えがちであるが、水では口腔内に辛味成分が広がるリスクがある。トウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドは親油性であることから、牛乳などの乳製品を飲むと良いともいわれる。同様に脂質が多いバタークッキーなどを食べると良いという人もいる。テレビで報道されて広がった痛みを軽減する食品としては、コーヒーがある。

これらすべてに科学的なデータもなく、「辛味が抑えられた気がする」という主観的なものばかりである。さらに、口にする食品も直接トウガラシを食べるなど、辛味を一定として評価を行っていない。定量的に比較するには、(1)一定の辛味で摂取しやすい辛味標準食を設計し、(2)それらを用いて口腔内の辛味の残存度合いを数値化して評価する必要がある。

本研究では、カプサイシノイド含量を測定したトウガラシ粉末を用い、飲みやすいように鶏ガラスープに溶解した辛味標準食を作製した。この辛味標準食を飲み込んだ直後に、試験食品を口腔内に広げてから飲み込んだ。試験食品の嚥下直後からのヒリヒリする痛み継続時間を測定し、水を用いた場合を100として定量化した。本評価手法では、一般にいられていた牛乳、コーヒーにヒリヒリする痛み継続時間を短縮する効果はなかった。しかし、ブルーベリーを摂取すると水に比べてヒリヒリする痛み継

続時間が短くなることがわかった。本研究では、辛味食品摂取後の口腔内のヒリヒリする痛み継続時間を測定する評価手法を開発し、口腔内のヒリヒリする痛みを軽減する効果を持つ食品として、ブルーベリーを初めて見出した。

## 1. 材料と方法

### 1-1. 試験食品

ミネラルウォーター（以下、「水」と示す）、牛乳、コーヒー、レモン、ブルーベリー（生果実）、赤ワイン、インスタントココア、ティーパックタイプのお茶を試験食品として用いた。いずれも食料品店で市販されていたものを用いた。試験食品として摂取する際は、レモンを除きペースト状または液状とした。摂取の際には、温度を室温として、形状や温度の差を最小限にとどめた。

### 1-2. 辛味標準食の調製

一定の辛味で評価するため、辛味標準食を設計した。一味トウガラシ（SB 食品）を鶏ガラスープ（味の素）に溶かした。コントロールとして用いた水を飲み込んでから、1分間ほどヒリヒリする痛みが継続する程度に一味トウガラシの量を調節した。結果として、お湯 200mL に鶏ガラスープを小さじ 1、一味トウガラシを小さじ 1 溶解したものを辛味標準食として用いた。辛味を含む食品は、温度によって辛味の感じ方が異なるので一定の温度にする必要がある。辛味標準食として飲みやすくすることを考慮し、放射型温度計を用いて 50～60℃の範囲であることを確認して評価に用いた。

### 1-3. 痛み継続時間測定方法と試験食品の評価方法

口腔内の痛みの軽減評価は、評価者による官能評価によって行った。評価は、名古屋文理大学健康生活学部の学生 22 名（20～22 歳、男性 12 名、女性 10 名）を評価者として行った。体調不良などの健康に不安のない状態であることを確認した上で実施した。評価は火曜日の 10 時半から 12 時（図 1 の評価）、もしくは、14 時半から 16 時（図 2 の評価）に行った。辛味標準食 15 mL を口に含み 5 秒間保持してから飲み込み、その直後に試験食品を口に含み、15 秒間保持してから飲み込んだ。試験食品を飲み込んだ直後の時間を 0 秒として、口腔内、特に

舌に感じるヒリヒリする痛み（以下、「痛み」と呼ぶ）が消失するまでの時間を測定した。痛みが消えた後に舌に残存する麻痺したような違和感（以下、「違和感」と呼ぶ）が消失するまでの時間も測定した。痛みの感じ方（強弱）には個人差があるので、試験食品として水を用いた場合の痛み、もしくは違和感が消失するまでの時間を 100 として、各試験食品の痛みおよび違和感の相対的継続時間を用いて評価した。辛味は連続して摂取すると感じ方が変化するので、連続強度評定試験を参考に 30 分以上の間隔を開けて、次の評価を行った<sup>6)</sup>。辛味は痛みの一部であることを考慮して、倫理的配慮に基づき 1 日あたりの評価数は 5 回を上限とした。

### 1-4. 研究における倫理的配慮

評価者には、評価を行う前に、「名古屋文理大学人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準じて、評価の目的、参加は自由であり途中で中止できること、匿名で行い個人情報厳守されることを説明した。また、使用する食品を明らかにし食物アレルギー等を有している者は参加できないこと、参加拒否による不利益を被らないことを説明し、同意を得た上で実施した。自由意志参加の結果、苦手な食品のある評価には参加していない者もいるので、各食品における評価者の人数は異なっている。

## 2. 結果

### 2-1. 辛味標準食の設計

最初に、辛味を一定として摂取しやすい辛味標準食について複数検討した。トウガラシは乾燥物、またその粉末として販売されていることが多い。トウガラシを主成分とするソースやペースト状の調味料もある。ソースやペーストは混合物であるため一定の辛味であるメリットは大きいものの、塩分や他の成分を多く含むことから辛味標準食の候補から除外した。辛味標準食を設計するにあたって、いつ、どこでも試験をできることを想定して、持ち運びが容易で小さく一粒単位で摂取できるトウガラシ（新京野菜「京の黄真珠」）を最初に用いた。しかし、辛味が強いこと、芳香性が強いこと、果実ごとに辛味に若干の差を生じることなどから安定した結果が得られなかった。トウガラシを含む市販の油で揚げたスナックや焼き菓子なども検討したが、飲み込むま

での時間に差が生じる、口腔内に残存する量に違いがあるなどの問題があった。そこで携帯性をあきらめ、一定の辛味を調節しやすいスープについて検討した。トウガラシをお湯に溶解しただけでは、飲みにくいことから即席の中華スープなどを検討して、最終的に多くの人が飲みやすいと感じる鶏ガラスープとした。

辛味を含むスープは温度によって辛味の感じ方が異なる。辛味を一定にするためには、毎回等しい量を一口で飲める必要がある。一口で飲みやすい温度として、評価者の意見を参考に 50～60℃とした。

## 2-2. 効果あると知られる既存食品の試験

一般に、牛乳、コーヒーなどに口腔内の痛み軽減効果あると知られている。候補素材を探す事前試験でこれらの食品についても確認したが、明確な痛み軽減効果はなかった。同様に、ヨーグルトやチーズなどの乳製品でも効果はなかった。その他、油分の多い食品として、バタークッキー、ナッツ類でも効果はなかった。甘みで辛味を消すという考え方もあり、蜂蜜も試したが、効果はなかった。この事前試験は、上述の「辛味標準食」を用いず、乾燥トウガラシや辛味の強いスナックを食べた後の痛み軽減効果である。

辛味は舌で感じる痛みであるから、麻酔効果を持つ食品であれば、効果が期待できる。生薬の一つであるセンソは、皮膚や粘膜などに接触した場合に局所麻酔作用を示す。一般的に販売されている生薬を用いた強心剤のうち、六神丸にはセンソが含まれている。トウガラシを食べた後の舌にヒリヒリする痛みを感じる状態で、六神丸を舌の上に乗せてゆっくり溶かすと、痛みは消えた。しかし、しびれや麻痺が継続して起こり、辛味によるヒリヒリする痛みよりも不快感があり、1時間以上も舌の感覚麻痺状態が続いた。評価者からは、六神丸による麻痺は慣れていない感覚であり、不快に感じたとの意見が多かった。

## 2-3. 評価手法の検討

辛味標準食の設計と同時に、様々な食品において痛み軽減効果を検討してきた。その中で、ブルーベリーに口腔内のヒリヒリする痛みを軽減する可能性がわかった。摂取量を増やすと、比較的早く痛みが

収まる可能性も示唆された。そこで、この効果を数値化する方法を構築した。

口腔内の痛みの軽減についての定量的な評価方法は、これまでに研究報告はない。一方、特許では辛味抑制物質が出願されている。特許文献「特開 2014-14279」<sup>4)</sup>においては、乾燥ビール酵母におけるキムチスープの辛味抑制評価を行っている。10名の評価者により1～7点の7点評価を行っている。また、特許文献「特開平 8-298957」<sup>7)</sup>では、辛味の強さ 6＝強烈な辛味を感じる～辛味の強さ 1：辛味を感じない、といった6段階で評価している。これらの方法は辛味が抑制されている度合いはわかるものの、本研究における食後の痛みの軽減の定量的評価とは異なる。

そこで新たな方法を検討した。本研究目的は、食後の口腔内の痛みを軽減することである。一定の辛味を持つ食品を対象とすれば痛みは同じ時間継続するので、軽減とは、食後に感じた痛みを短時間で消すことと同等であると考えた。痛みの継続時間であれば、数値評価が容易になる。辛味標準食は飲み込みやすいように大きじ 1 杯 (15 mL) とした。本研究では、口腔内に辛味によるヒリヒリする痛みを生じさせるために、5 秒間スープを口の中で保持してから飲み込むこととした。辛味標準食を飲み込むと同時に、試験食品を口にした。後述するように、ペースト状の食品も試験を行ったため、なめらかな液体と異なり全量を口に含む時間が少し長くなる。そこで、口に含み始めて飲み込むまでの時間を 15 秒間に統一した。すなわち、辛味標準食を飲み込むと同時に、試験食品を口に、15 秒間保持してから飲み込んだ。この試験食品を飲みこんだ時間を 0 秒として、辛味によるヒリヒリする痛みを感じなくなるまでの時間を測定した。痛みが消えた後に舌に残存する麻痺したような違和感が残ることから、この違和感が消えるまでの時間も測定した。辛味に対する感覚は評価をする個人差、また個人においても日や時間帯によって差が生じたので、その日の評価の最初に試験食品として水を用い、痛みを感じなくなった時間、および違和感のなくなった時間をそれぞれ 100 として評価することとした。この事によって安定的な結果が得られるようになった。

## 2-4. ブルーベリーの辛味による口腔内の痛み軽減効果の検証

上述した効果測定手法を確立した後、一般的に激辛食品を食べたときの痛みを軽減するといわれる牛乳、レモン、コーヒーと、ブルーベリーについてその痛み軽減効果を測定した。Web 情報などをもとにレモンに関してはスライスしたレモン果実をそのまま口にする事とした。またブルーベリーについても初期の候補食材の探索で用いた条件に合わせて、生果実 20g とした。痛みと違和感の測定時間を図 1A に示した。水の場合、痛みは 1 分半程度続いた。牛乳、レモン、ブルーベリーでは痛みの継続時間は短くなる傾向が見られた。痛みの感じる時間に個人差が大きかったため、水を 100 とした場合の痛みと違和感の消失までの相対時間を用いて比較した (図 1B)。

\*\* は水と比較した場合に、t 検定 (両側検定, 非等分散) において P 値が 0.01 以下となり有意差の確認されたものを示す。牛乳は、痛み、違和感ともに水よりも短い時間で消失したが有意差はなかった。コーヒーでは痛みも違和感も水と比較して短くなることはなかった。コーヒーに関しては、インターネット上の Web 記事や動画サイトでもその効果があるといわれているが、評価者によると、苦味によって一時的に辛味を感じなくなるだけで、苦味が消えた後に痛みを感じるのとことであった。苦味によって辛味を相殺するには、辛味を感じる時間、ずっと口腔内に苦味を感じる成分を維持す

る必要があるだろう。レモンを口にすると、痛みは水と比較して 60% の時間で消失したが、違和感には変わらなかった。評価者の感想では、酸味の刺激により痛みがごまかされているようであり、口腔内の違和感は残り続けたとのことである。コーヒーの苦味やレモンの酸味は、一時的に痛みを感じさせなくするようだ。辛味以外の味覚刺激を強めれば、辛味を相対的に分かりにくくすることが可能かもしれない。ブルーベリーについては、痛みも違和感も 6 割程度の時間で消失し、有意差があることがわかった。

## 2-5. ポリフェノールを含む食品の評価

ブルーベリーは辛味による口腔内の痛み軽減作用を持つ可能性が示された。しかし、最初の検討では、生果実を咀嚼して使用したため、咀嚼による効果、例えば唾液分泌の影響の可能性がある。そこで、ブルーベリーをペースト状にし、すべての食品を液状として比較検討した (図 2)。評価者の集団も変更してブルーベリーの効果の再現性を検証した。評価者数は 10 ~ 11 名である (ココア、赤ワインについては苦手とする評価者では試験を行っていない)。

水を用いた痛みの継続時間は 1 分程度であった (図 2A)。ブルーベリー、赤ワイン、ココアでは、痛みの継続時間が短くなる傾向が見られた。痛みの感じ方に個人差があるので、先の評価と同様に、水を用いた継続時間を 100 とした相対時間で比較した

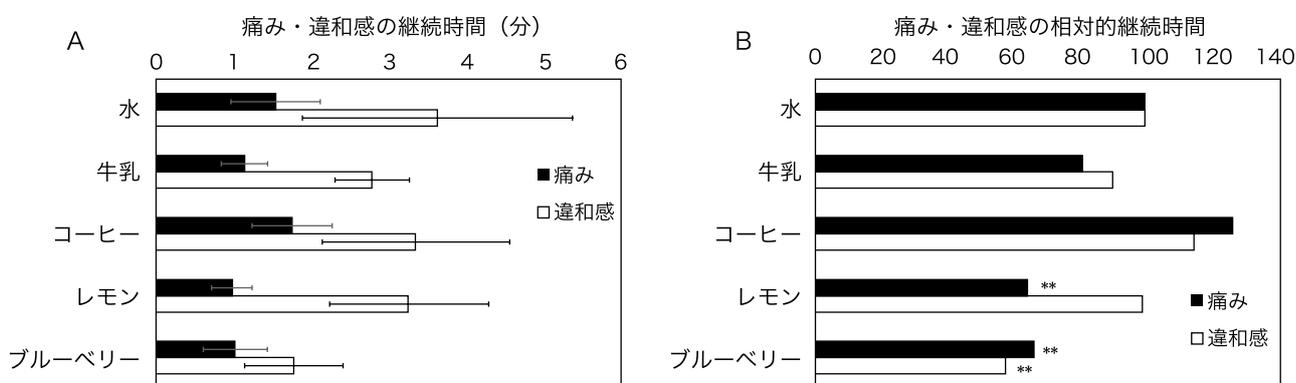


図 1 痛み・違和感の継続時間 (A) と相対的継続時間 (B)

黒いバーは痛み、白いバーは違和感を示す。

A. 水、牛乳、コーヒー、レモン、ブルーベリー摂取後の痛みと違和感の継続時間

エラーバーは標準偏差を示す。牛乳とコーヒーは  $n=5$ 、レモンは  $n=8$ 、ブルーベリーは  $n=11$  である。

B. 水を 100 とした場合の相対的な痛みと違和感の相対的継続時間

\*\* は水と比較した場合に、t 検定 (両側検定, 非等分散) において P 値 0.01 以下であることを示す。

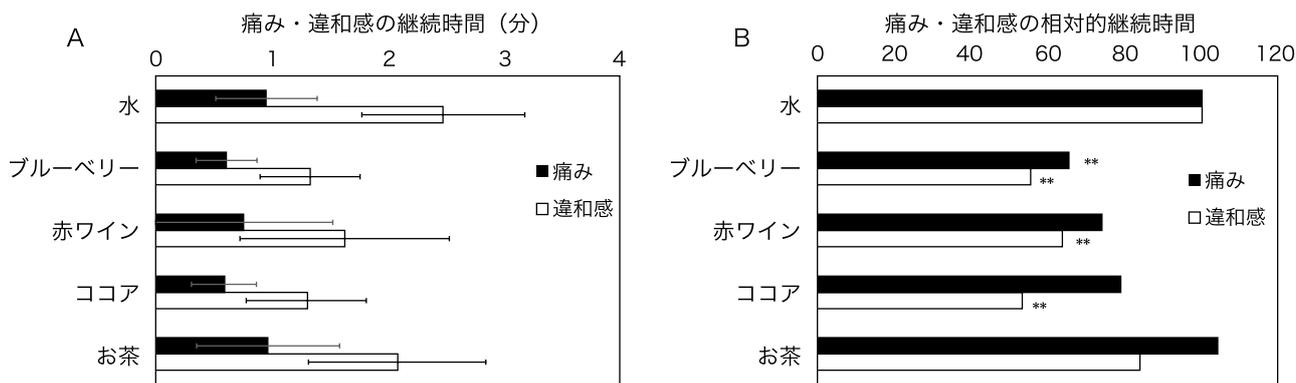


図2 ポリフェノールを含む食品による痛み・違和感の継続時間 (A) と相対的継続時間 (B)

黒いバーは痛み、白いバーは違和感を示す。

A. 痛み・違和感の継続時間

エラーバーは標準偏差を示す。水とブルーベリーとお茶は  $n=11$ 、赤ワインとココアは  $n=10$  である。

B. 水を 100 とした場合の痛み・違和感の相対継続時間

\*\* は水と比較した場合に、t 検定 (両側検定, 非等分散) において  $P$  値 0.01 以下であることを示す。

表1 試験食品 100g に含まれるアントシアニン, ポリフェノール量

試験食品	mg/100g	備考
ブルーベリー アントシアニン量	199	測定値
赤ワイン ポリフェノール量	300	商品ラベル記載値
ココア ポリフェノール量	508	商品ラベル記載値
お茶 ポリフェノール量	94 ~ 148	文献値 <sup>8)</sup>

ブルーベリーは測定したアントシアニン量を示す。お茶は文献値<sup>8)</sup>を示した。

(図 2B)。ブルーベリーについては図 1B と同様に、痛み、違和感ともに軽減し、有意差があった。赤ワインでは、痛みの軽減はみられるものの有意差は示されなかった。赤ワイン摂取後の違和感については、水よりも 60% ほどの時間で軽減された。ココアについても痛みの軽減には有意差は示されなかったが、違和感についてはブルーベリーと同等の軽減を示した。お茶に関しては、痛み、違和感ともに有意差はなかった。

ブルーベリーは、アントシアニンを多く含む食品である。アントシアニンはポリフェノールの一種なので、本評価ではポリフェノールを含む食品の影響を検討した。試供した食品として、高ポリフェノール含有と知られる赤ワイン、ココアとお茶を選んだ。試供したブルーベリーで測定したアントシアニン含量、パッケージや文献に示される比較食品のポリフェノール量を表 1 に示す。ココアに含まれるポリフェノール量は最も多く、ブルーベリーの 2 倍以上摂取している。痛みの軽減効果はブルーベリーと差はなく、ポリフェノール含有量と痛みの軽減効果に相関関係は見られなかった。

### 3. 考察

本研究では、辛味食品を摂取後の口腔内のヒリヒリする痛みを軽減する食品の探索を行った。テレビやインターネット動画サイトでは、コーヒーに痛み軽減効果があるとされている。しかしながら、個人の感想に基づくものが多く、定量性に乏しい。そこで本研究では、効果のある食品の探索と同時に、効果を数値化する方法を検討した。辛味を一定としたスープを用いて、嚥下後に口腔内 (主に舌) で感じる痛みと違和感が消失するまでの時間を測定する方法を開発した。

開発した測定方法によって、ブルーベリーに辛味食品を摂取後の口腔内の痛みを感じる時間を短くする効果があることが明らかになった。しかし、本方法では、水と比較して半減する程度で、完全に痛みを消すことはできていない。これは、方法にも問題がある。試験食品は 15 秒保持した後、飲み込んでいる。したがって、舌に残存しにくい成分であれば、口腔内に食品を保持している間だけ痛みを抑え、飲み込んだ直後から痛みを感じるようになるだろう。より効果を引き出すには、効果成分を含む食品を長

時間口腔内に保持する必要がある。このことから、飴やタブレットなど、口腔内に長時間保持できるような食品形状とすることで、より効果を高めることも可能かもしれない。今後、食品形態の検討が必要である。

ポリフェノールを多く含む食品でも違和感の継続時間の軽減作用を示したが、ポリフェノール含有量との明確な関係は得られなかった。ブルーベリーに

含まれる効果成分を特定することができれば、どのような形状で摂取すれば効果を強めることができるのかを検討することもできる。

コーヒーの苦味やレモンの酸味には辛味を紛らわす可能性も示唆された。ブルーベリーのみならず、苦味や酸味を活用して、複数の成分を組み合わせることで、より短時間で口腔内の痛みを緩和する食品を設計できる可能性がある。

## 参考文献

1. 鳴神寿彦, 井上泰至, 時友裕紀子, 君塚明光, 前田安彦: 食生活と辛味. トウガラシ - 辛味の科学, 初版. 岩井和夫, 渡辺達夫. 幸書房, 109-147, 2000.
2. 特開平 11-299448, 辛味抑制剤
3. 特開平 8-183083, 辛味抑制剤及び辛味が抑制された食品
4. 特開 2014-14279, 辛味抑制剤
5. Tetsuya Seki, Masafumi Ota, Hiroto Hirano, Kiyotaka Nakagawa: Characterization of newly developed pepper cultivars (*Capsicum chinense*) 'Dieta0011-0301', 'Dieta0011-0602', 'Dieta0041-0401', and 'Dieta0041-0601' containing high capsinoid concentrations and a strong fruity aroma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**: 1870-1885, 2020.
6. 森谷愛美: 連続強度評価による飲料の後味の評価. 味嗅覚の科学. 齊藤幸子, 小早川達. 朝倉書店, 218-224, 2018.
7. 特開平 8-298957, 辛味抑制剤
8. 神戸保, 島津 (生田) 統子, 平野朋子: 茶葉からの緑茶浸出条件と浸出液中の成分量. 別府大学紀要 **47**: 61-70, 2006.

# クマ笹葉アルカリ抽出液（ササヘルス<sup>®</sup>）の 抗炎症作用のマルチオミックス分析

坂上 宏 (SAKAGAMI Hiroshi)<sup>1\*</sup>, 中谷 祥恵 (NAKATANI Sachie)<sup>2</sup>, 榎本 文芽 (ENOMOTO Ayame)<sup>3</sup>,  
太田 紗菜 (OTA Sana)<sup>3</sup>, 金子 未来 (KANEKO Miku)<sup>3</sup>, 杉本 昌弘 (SUGIMOTO Masahiro)<sup>3, 4</sup>,  
堀内 美咲 (HORIUCHI Misaki)<sup>5</sup>, 戸枝 一喜 (TOEDA Kazuki)<sup>5</sup>, 大泉 高明 (OIZUMI Takaaki)<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 明海大学歯科医学総合研究所 (M-RIO) \* 責任著者: 坂上宏 sakagami@dent.meikai.ac.jp

<sup>2</sup> 城西大学大学院薬学研究科

<sup>3</sup> 慶應義塾大学先端生命科学研究所

<sup>4</sup> 東京医科大学医学研究所低侵襲治療研究開発センター

<sup>5</sup> 株式会社大和生物研究所

**Key Words:** クマ笹葉アルカリ抽出液, ヒト歯肉線維芽細胞, IL-1 $\beta$ , 抗炎症, PGE<sub>2</sub>, メタボローム解析, DNA マイクロアレイ, 細胞の生存, アポトーシス, ケモカイン

## 要約

本論文は, ELISA, メタボローム解析, DNA マイクロアレイ解析を用いてクマ笹葉アルカリ抽出物 (SE) の抗炎症作用発現の初期過程における炎症性物質, 細胞内代謝物, 遺伝子の発現を検討した論文 (*J. Clin. Med.* 2021, 10, 2100. <https://doi.org/10.3390/jcm10102100>) の解説書である。ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に IL-1 $\beta$  を添加すると, 細胞増殖の促進と同時に PGE<sub>2</sub> の産生が顕著に増加した。SE も HGF の増殖を僅かに促進するが, IL-1 $\beta$  の PGE<sub>2</sub> 産生促進を用量および時間依存的に阻害した。この阻害作用は, IL-1 $\beta$  よりも前に SE を投与することにより強く発現された。IL-1 $\beta$  処理の 3 時間後に, 総アミノ酸, 総グルタチオン (GSH, GSSG, Cys-GSH ジスルフィド), メチオニンスルホキシド, 5-オキソプロリン, SAM の細胞内濃度が減少し, TNF, AKT, CASP3, CXCL3 の mRNA 発現が上昇した。これらの変化は, SE の同時投与により消失した。SE の抗炎症作用の発現が, 細胞の生存, アポトーシス, および白血球動員等の様々な代謝経路を介して媒介されることが示唆された。

## はじめに

我々は, 甘草の根<sup>1)</sup>, 緑茶およびウーロン茶の葉, オレンジの花<sup>2)</sup> のアルカリ抽出液が, 熱水抽出液よりもはるかに高い抗 HIV 活性を示すことを報告した。これは, アルカリ性の条件で抽出されるリグニン配糖体によるものと思われる。クマ笹葉アルカリ抽出液 (SE) は強力な抗ウイルス活性を示す。その化学療法係数 [SI=CC<sub>50</sub> (非感染細胞の 50% 細胞傷害濃度) / EC<sub>50</sub> (HIV 感染細胞の 50% 復帰濃度)] は 86 であり, リグニン配糖体の SI 値 [12 ~ 311 (平均:76) ( $n=6$ )] に匹敵し, タンニン類 (SI=1.1 ~ 7.3) ( $n=75$ ) およびフラボノイド類の SI 値 (SI=1.5 ~ 24) ( $n=114$ ) の 10 倍以上であった<sup>3)</sup>。さらに, SE

は強力な抗炎症活性を示し, 歯肉線維芽細胞 (HGF) における PGE<sub>2</sub> の産生, COX-2 タンパク質の発現, インターロイキン (IL) -8 産生を阻害した<sup>3,4)</sup>。SE は, 天然から, グラムオーダーで調製することができるので, うがい薬や練り歯磨きなどの市販 (OTC) 薬の製造に適している<sup>5)</sup>。高速液体クロマトグラフィーにより, SE の成分同士が会合して存在する可能性が示唆された<sup>6)</sup>。本解説書は, SE の作用点を明らかにするために, IL-1 $\beta$  誘発性歯肉線維芽細胞の炎症の早期過程における, 炎症マーカー, 細胞内代謝産物と mRNA 発現の変動について検討した論文<sup>7)</sup> を紹介する。

## 1. 材料と方法

**材料:** SE は、鉄イオン置換、アルカリ抽出、および中和/脱塩によって調製された。SE は、 $58.2 \pm 0.96 \text{ mg}$  の固形物 / mL を含む<sup>5,8)</sup>。歯肉線維芽細胞 (HGF)、歯根膜線維芽細胞 (HPLF)、および歯髄細胞 (HPC) は、学内倫理委員会のガイドラインに従い、12 歳の少女の下顎第一小白歯および歯周組織から樹立された<sup>9)</sup>。生細胞数は、MTT 法により測定した<sup>4)</sup>。培地に放出された PGE<sub>2</sub> の濃度は、酵素免疫測定法 (EIA) により定量した。

### メタボロミクス分析

10cm ディッシュにほぼコンフルエントな状態で生育している細胞を、無添加 (コントロール)、IL-1 $\beta$  (3 ng / mL)、SE (1%) または IL-1 $\beta$  (3 ng / mL) + SE (1%) で 3 時間処理した。5 mL の氷冷 5% D-マンニトールで 2 回洗浄後、内部標準を含む 1 mL のメタノールに 10 分間浸漬し、メタノール抽出物(上清)を回収した。水層をろ過して、5 kDa カットオフフィルターを通して、大きな分子を除去し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析 (CE-TOF-MS) に供した<sup>10,11)</sup>。

### DNA マイクロアレイ解析

RNA iso plus 試薬で、細胞から全 RNA を抽出した。200 ng の RNA サンプルをマイクロアレイ実験に供した。一本鎖および二本鎖 cDNA の合成は T7 プロモータープライマーを用いて行った。Cy3 標識 cRNA を T7RNA ポリメラーゼとシアニン 3-CTP で 40°C で 2 時間増幅し、RNAeasy キット (Qiagen) を使用して精製した。600 ng の Cy3 標識 cRNA を、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) を使用して 60°C で 30 分間断片化した。断片化された cRNA をアレイスライドにロードし、65°C で 17 時間ハイブリダイズさせた。マイクロアレイを、洗浄、乾燥後、スキャンした。最初のデータ分析は、特徴抽出ソフトウェア (Agilent) を使用して実行され、外れ値のピクセルを除外し、統計的信頼度を計算した。分析された各遺伝子の機能、アノテーションクラスタリング、および生物学的および分子的機能に関する詳細な情報は、Subio Platform Advanced Plugin (Subio Inc) および KeyMolnet Lite (IMMD Inc., 東京, 日本) ソフトウェアを使用して取得した。

## 2. 実験結果

### IL-1 $\beta$ による炎症の誘発

インターロイキン (IL) -1 $\beta$  は、歯肉線維芽細胞 (HGF) および歯根膜線維芽細胞 (HPLF) による PGE<sub>2</sub> 産生を約 100 倍増加させたが、歯髄細胞 (HPC) では増加させなかった。IL-1 $\beta$  の至適濃度は 3.1 ~ 12.5 (ng / mL) であった。HPLF よりも HGF で高い PGE<sub>2</sub> 産生が観察されたため、以下の実験では HGF を使用した。PGE<sub>2</sub> の産生は、IL-1 $\beta$  (3 ng / mL) 処理の 3 時間後に観察され、48 時間まで増加した。SE は、ELISA による PGE<sub>2</sub> の測定を妨害しないことを確認した。特に明記しない限り、HGF を IL-1 $\beta$  (3 ng / mL) で 48 時間処理することにした。

### SE の前投与は、歯肉線維芽細胞の炎症を効果的に阻害する。

SE は用量依存的に IL-1 $\beta$  誘発性 PGE<sub>2</sub> 産生を減少させた。1~2% の SE を添加すると、PGE<sub>2</sub> の産生はそれぞれ 9.1~3.0% にまで減少した。SE の阻害効果は、IL-1 $\beta$  添加前に SE を添加した場合により顕著であった。SE を添加する前に IL-1 $\beta$  と長時間プレインキュベートすると、SE の阻害効果は徐々に低下した。これは、SE の一部が細胞外で IL-1 $\beta$  に結合し、IL-1 $\beta$  の細胞受容体への結合をブロックし、IL-1 $\beta$  のシグナル伝達を阻害する可能性を示唆する。

### IL-1 $\beta$ と SE の増殖促進効果 (ホルミシス効果)

IL-1 $\beta$  と SE は、HGF の増殖を、僅かではあるが促進した。SE は、無血清培地で分化したラット PC12 神経細胞の増殖を刺激するので<sup>12)</sup>、SE は様々な細胞の増殖を促進する可能性がある

### メタボローム分析

HGF から、計 153 の代謝物が検出された。リグニン配糖体 (LCC) の前駆体の 1 つである *p*-クマル酸が細胞および培養液の両方から検出された。このことは、SE が卓越した抗ウイルスを示す LCC を含むことを示している。HGF を IL-1 $\beta$  で処理すると、計 18 個のアミノ酸が 38% 減少した (表 1)。また、総グルタチオン (GSH, GSSG, およびシステイン-グルタチオンジスルフィド)、酸化ストレスマーカーであるメチオニンスルホキンド (メチオニンの酸化生成物)、5-オキソプロリン (プロリン

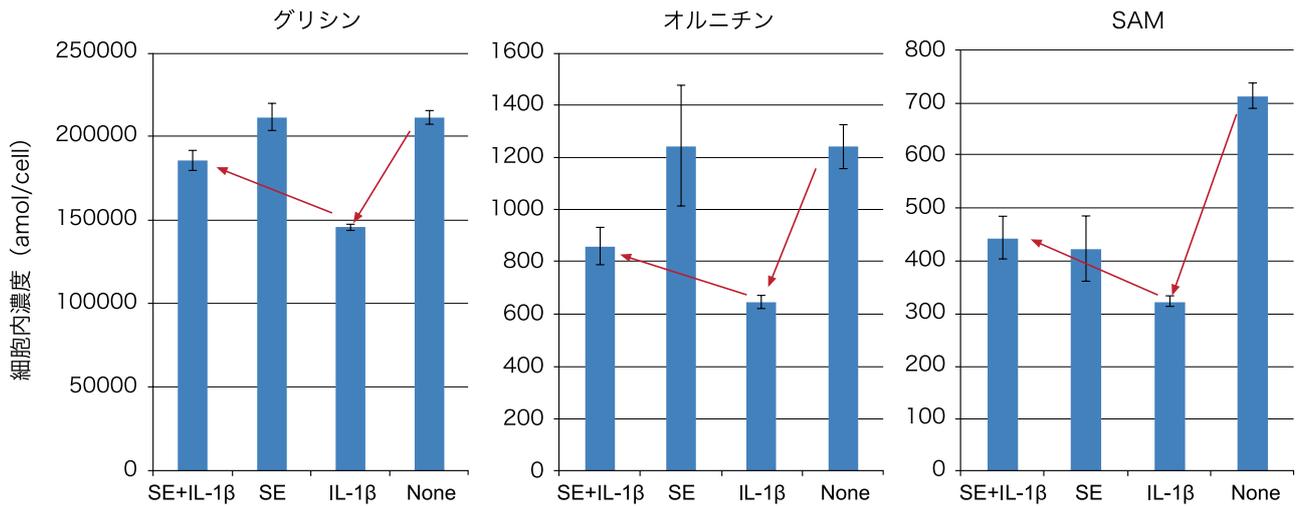


図1 SEは、IL-1β投与による細胞内代謝産物の変動を元の状態に戻す

表1 IL-1βによる低下し、SEで復帰する代謝物

	代謝物 (amol/cell)							
	Control	(%)	IL-1β	(%)	SE	(%)	SE+IL-1β	(%)
総アミノ酸	1420101	100	954178	67	1235525	86	1093552	77
グルタチオン類								
GSH	41743	100	45315	109	40377	97	36927	88
GSSG	19334	100	6905	36	17109	88	15965	83
Cys-GSH disulfide	461	100	27	6	394	85	329	71
計	61538	100	52248	85	57880	94	53221	86
酸化物等								
メチオンスルホキシド	283	100	175	62	316	112	297	105
5-オキソプロリン	8806	<b>100</b>	7801	<b>89</b>	8281	<b>94</b>	9507	<b>108</b>
SAM+	713	<b>100</b>	324	<b>45</b>	426	<b>60</b>	443	<b>62</b>
ATP・GTPの利用率								
AMP/ATP	0.0066	100	0.0124	188	0.0071	108	0.009	137
ADP/ATP	0.0631	100	0.1012	160	0.0737	117	0.0797	126
GMP/GTP	0.0108	100	0.0156	144	0.0089	82	0.0117	109
GDP/GTP	0.0499	100	0.0676	135	0.0514	103	0.055	110

<sup>1</sup> 各値は4サンプルの測定値の平均である。

の酸化生成物)、およびメチル基供与体のS-アデノシルメチオニン (SAM) が僅かに減少した。これらの変化は、SEの同時投与により逆転した。IL-1β処理により、ATP利用率 (AMP / ATP と ADP / ATP の比率で評価) とGTP利用率 (GMP / GTP と GDP / GTP の比率で評価) が、それぞれ60~88%、35~44%上昇した。これは、アポトーシスのみならず

エネルギーの消費が増加する可能性を示唆する。これらの変化は、SEによってほぼコントロールレベルに戻った (図1, 表1)。

#### DNA アレイ分析

不適切なスポットを削除した後、57,432個のスポットが選択された。正規化後、コントロール

と比較してLog2 (2) 以上の変動がある16405スポットをDNAマイクロアレイ分析に供した。次に、IL-1βにより2倍以上発現が増強され、SEの同時添加により1/2に減少する遺伝子を抽出し、366個の遺伝子を得た。これらの遺伝子を、KEGGパスウェイ解析にかけた。IL-1βは、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー2 (TNFA) (2<sup>1.439</sup>倍), RACセリン/スレオニンプロテインキナーゼ (AKT) (2<sup>2.32</sup>倍), カスパーゼ3 (CASP3) (2<sup>1.027</sup>倍)を含む26の遺伝子のmRNAの発現を誘導した。これらの遺伝子発現の上昇は、SEを同時に添加することによって抑制された。特に、CASP3はIL-1βを添加することでコントロールの約2倍(2<sup>1.072</sup>倍)誘導されたが、SEの同時添加でコントロールレベルに戻った(表2)。一方、TNF経路上のCXCモチーフケモカイン(CXCL3)などのケモカインは大幅に増加したが(2<sup>8.826</sup>倍)、発現はコントロールレベルに戻らなかった。

3. 考察

本研究は、SEが歯肉線維芽細胞におけるIL-1β誘発性炎症(PGE<sub>2</sub>産生および他の炎症性サイトカイン)を阻害すること<sup>4)</sup>、そしてIL-1β処理後に、SEで処理すると、SEの抗炎症作用が部分的に阻害されることを明らかにした。これは、SEの抗炎症作用の一部は、SEがIL-1βあるいはIL-1β受容体をマスキングするためであることを示唆する(図2)。HGFは刺激時に様々な炎症性サイトカインの受容体を発現しているため<sup>13)</sup>、SEは全てのサイトカインのリガンドと受容体間の相互作用を非特異的に阻害する可能性がある。

SEには、リグニン配糖体とその分解生成物など多数の成分が含まれている<sup>8)</sup>。このような成分は互いに結合し、凝集した形を作る<sup>6)</sup>。現在、どの成分または凝集体形成がSEの抗炎症作用の原因であるかは明らかではない。メタボローム解析により、(i) SEがリグニン配糖体の分解生成物の1つであるp-クマル酸を含み、(ii) 細胞一個あたり、332原子のp-クマル酸が取り込まれ、(iii) IL-1β処理

表2 IL-1βによって減少し、SEの同時投与により復帰する細胞内代謝物

	発現度 (2 <sup>n</sup> -倍の増加)			
	Control	SE	IL-1β	SE+IL-1β
<腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー2>				
TNF	0.000	0.000	1.439	0.255
TNFα	0.000	0.000	1.439	0.255
<増殖>				
AKT	0.000	-0.189	2.320	-0.309
AKT2	0.000	-0.189	2.320	-0.309
<細胞死>				
caspase	0.000	-0.705	1.072	-0.151
caspase-3	0.000	-0.705	1.072	-0.151
<ケモカイン(細胞の遊走)>				
CXCL3	0.000	0.110	8.826	7.756
CXCL5	0.000	-0.301	3.038	1.990
CXCL10	0.000	0.000	3.254	2.252
CCL7	0.000	0.000	4.148	3.141

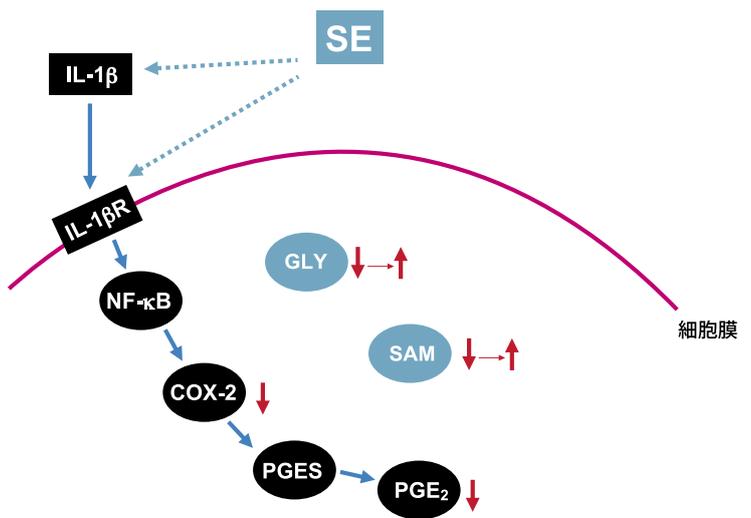


図2 SEは、種々の炎症性サイトカインと受容体との結合に影響するののか？

により、培養液中のp-クマル酸の濃度が146 μMから139 μMに減少し、逆に細胞内濃度が細胞あたり511原子まで増加した。これは、SEの抗炎症作用の一部をp-クマル酸が担っている可能性を示唆している。しかし、この可能性は、HPLFに対するp-クマル酸の抗炎症活性[化学療法指数CI (= CC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>) > 3.1]がSE (CI > 96.3) よりはるかに低いということより除外された。また、クルクミン、没食子酸、フェルラ酸などの他の一般的なポリフェノールの抗炎症作用が非常に低いことも明らかになった

表3 SEはIL-1 $\beta$ の作用を逆行させる

	+ IL-1 $\beta$	+ SE+ IL-1 $\beta$
<b>メタボローム解析</b>		
19 アミノ酸 (システインとグルタミン酸を除く)	↓	→ ↑
総グルタチオン (GSH, GSSG, Cys-GSH disulfide)	↓	→ ↑
メチオニンスルホキシド	↓	→ ↑
5- オキソプロリン	↓	→ ↑
SAM	↓	→ ↑
<b>DNA マイクロアレー解析</b>		
AKT (細胞生存)	↑	→ ↓
CASP3 (アポトーシス)	↑	→ ↓
CXCL3 (白血球のリクルート)	↑	→ ↓

(CI = 0.94 ~ 2.9)。一方、半夏瀉心湯<sup>14,15)</sup>などの日本の伝統薬 (漢方) は、IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 産生を、SE と同程度に抑制した (CI = 100)。半夏瀉心湯と SE のエンドトキシン汚染度は、それぞれ 8.7 (15) と <2 ng / g (アルカリ抽出の過程で、LPS のエステル結合が切断したため検出限界以下となった) であった。これらのデータは、SE の抗炎症活性が低分子量ポリフェノール類よりも高く、漢方薬の抗炎症活性に匹敵することを示している。

本研究は、SE は IL-1 $\beta$  の作用を逆行させることを明らかにした (表 3)。IL-1 $\beta$  がアミノ酸の細胞内濃度の約 40% を減少させることを示したが、これは、炎症反応により多くのアミノ酸の消費が増大したためだろうか? また、SE の添加によってある程度細胞内アミノ酸の濃度は、元のレベルに復帰した。同様に、SE は IL-1 $\beta$  により誘発された総グルタチオンとメチオニンスルホキシドおよび 5- オキソプロリンの低下をある程度緩和した。これは、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の添加による IL-1 $\beta$  誘発性 HGF の炎症が悪化する過程で、メチオニンスルホキシドと 5- オキソプロリンが低下することと辻褃があう。メチオニンスルホキシド<sup>16-18)</sup> と 5- オキソプロリン<sup>19-21)</sup> はいずれも酸化ストレスマーカーとして認められつつあり、SE は細胞を酸化ストレスに耐える状態に誘導する可能性がある。

我々は、細胞内 SAM 濃度が、IL-1 $\beta$ 、次に TiO<sub>2</sub> ナノ粒子によって引き起こされる炎症の悪化とともに段階的に低下することを以前に報告した<sup>10)</sup>。本研究は、SE による炎症からの回復中に、SAM が僅かではあるが対照レベルに戻ることを示した (表

1)。SAM は、メチオニンと ATP からメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (EC 2.5.1.6) により循環経路 (一炭素代謝と呼ばれる) で合成される。炎症が惹起すると、メチオニンと ATP のレベルが低下し、その結果、メチル基供与体の SAM が低下する。DNA とヒストンのメチル化はさまざまな遺伝子の発現を抑制することが知られているため、SAM の供給が低下すると、炎症誘発性サイトカインの発現が増強される可能性がある<sup>22)</sup>。したがって、SE による SAM の増加は、抗炎症作用の引き金と見なすことができる。

IL-1 $\beta$  は炎症反応の重要なメディエーターであり、細胞増殖、分化、アポトーシスなどのさまざまな細胞活動に関与している。現在の DNA マイクロアレー分析は、IL-1 $\beta$  刺激により、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 2 (TNFA), RAC セリン / スレオニンタンパク質キナーゼ (AKT), およびカスパーゼ 3 (CASP3) 経路が活性化された。これらは SE によりキャンセルされた。サイトゾルの ATP レベルの上昇はアポトーシス細胞死誘導の必要条件であるため、ATP および GTP 利用の増加はアポトーシスの誘導に有利に働く<sup>23)</sup>。いくつかの論文は、IL-1 $\beta$  による HGF の軽度のアポトーシスの誘導 (アネキシン染色によって検出) を報告している<sup>24)</sup>。また、IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B 経路を活性化して HGF の穏やかな増殖の促進を誘発し<sup>25)</sup>、我々のデータを裏付けている。IL-1 $\beta$  はマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) も増加させた<sup>26,27)</sup>。トランスフォーミング成長因子 (TGF) - $\beta$ 1 または IL-1 $\beta$  による同時刺激は、弱いアポトーシスを誘発し、IL-8 およ

び VEGF 産生を増強する<sup>28)</sup>。このような弱いアポトーシスは、HGF において炎症性サイトカインと付着分子を誘発し、歯周病の悪化につながる可能性がある。

IL-1 $\beta$  は、PI-3K 依存的に 473 セリンリン酸化による Akt の活性化を誘導し、Akt の阻害は、HGF における IL-1 $\beta$  を介した DEC1 (胚-軟骨細胞発現遺伝子 1) および HIF-1 $\alpha$  の誘導を抑制する。IL-1 $\beta$  はオンコスタチン M との相乗効果によりケモカイン CXCL10 と付着因子 ICAM-1 の発現を誘導するが<sup>29)</sup>、SE による CXCL10 の阻害は軽度であった (表 2)。これは、ケモカインが SE の抗炎症作用に密接には関与していない可能性を示唆している。

アルカリ性溶液で抽出される SE とリグニン配糖体は強力な抗ウイルス活性を示す。それらの抗ウイ

ルス活性<sup>30-36)</sup> は、タンニンやフラボノイド<sup>37-39)</sup> の 10-100 倍である。最近、SE は HSV と HIV の両方を瞬間的に不活化し、それらの化学療法指数はポビドンヨードよりもはるかに高いことを報告した。これは、ウイルス感染を予防するためのうがい薬において、SE がポビドンヨードよりも優れていることを示唆している<sup>5)</sup>。SE の抗炎症活性と強力な抗ウイルス活性の組み合わせは、相乗的に口腔環境を改善する可能性がある。

結論として、本研究は、SE の抗炎症作用が、細胞の生存、アポトーシス、および白血球動員のためのさまざまな代謝経路を介して媒介されることを初めて示した。SE は強力な抗炎症活性および抗ウイルス活性を示すので、口腔炎症およびウイルス誘発性口腔疾患への SE の適用が期待される。

## 参考文献

- Ohno, H.; Miyoshi, S.; Araho, D.; Kanamoto, T.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Tsuda, T.; Sunaga, K.; Amano, S.; Ohkoshi, E., *et al.*: Efficient utilization of licorice root by alkaline extraction. *In Vivo* **28**: 785-794. 2014.
- Sakagami, H.; Ohkoshi, E.; Amano, S.; Satoh, K.; Kanamoto, T.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Sunaga, K.; Otsuki, T.; Ikeda, H.; Fukuda, T.: Efficient utilization of plant resources by alkaline extraction. *Altern Integr Med*. 2013, 2, 2013 ISSN:2327-5162, 2013
- Sakagami, H. Biological activities and possible dental application of three major groups of polyphenols. *J Pharmacol Sci* 126: 92-106, 2014. doi:10.1254/jphs.14r04cr.
- Ono, M.; Kantoh, K.; Ueki, J.; Shimada, A.; Wakabayashi, H.; Matsuta, T.; Sakagami, H.; Kumada, H.; Hamada, N.; Kitajima, M., *et al.*: Quest for anti-inflammatory substances using IL-1 $\beta$ -stimulated gingival fibroblasts. *In Vivo* **25**: 763-768. 2011.
- Fukuchi, K.; Sakagami, H.; Sugita, Y.; Takao, K.; Asai, D.; Terakubo, S.; Takemura, H.; Ohno, H.; Horiuchi, M.; Suguro, M., *et al.*: Quantification of the ability of natural products to prevent herpes virus infection. *Medicines (Basel)* **7**: 2020. doi:10.3390/medicines7100064.
- Sakagami, H.; Zhou, L.; Kawano, M.; Thet, M.M.; Tanaka, S.; Machino, M.; Amano, S.; Kuroshita, R.; Watanabe, S.; Chu, Q., *et al.*: Multiple biological complex of alkaline extract of the leaves of *Sasa senanensis* Rehder. *In Vivo* **24**: 735-743. 2010.
- Sakagami, H.; Nakatani, S.; Enomoto, A.; Ota, S.; Kaneko, M.; Sugimoto, M.; Horiuchi, M.; Toeda, K.; Oizumi, T.: Multi-omics analysis of anti-inflammatory action of alkaline extract of the leaves of *Sasa* sp. *J. Clin. Med.* **10**: 2100. 2021. <https://doi.org/10.3390/jcm10102100>
- Sakagami, H.; Matsuta, T.; Satoh, K.; Ohtsuki, S.; Shimada, C.; Kanamoto, T.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Morita, Y.; Ohkubo, A., *et al.*: Biological activity of SE-10, granulated powder of *Sasa senanensis* Rehder leaf extract. *In Vivo* **26**: 411-418. 2012.
- Kantoh, K.; Ono, M.; Nakamura, Y.; Nakamura, Y.; Hashimoto, K.; Sakagami, H.; Wakabayashi, H.: Hormetic and anti-radiation effects of tropolone-related compounds. *In Vivo* **24**: 843-851. 2010.
- Garcia-Contreras, R.; Sugimoto, M.; Umemura, N.; Kaneko, M.; Hatakeyama, Y.; Soga, T.; Tomita, M.; Scougall-Vilchis, R.J.; Contreras-Bulnes, R.; Nakajima, H., *et al.*: Alteration of metabolomic profiles by titanium dioxide nanoparticles in human gingivitis model. *Biomaterials* **57**: 33-40, 2015. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.03.059.
- Sugimoto, M.; Wong, D.T.; Hirayama, A.; Soga, T.; Tomita, M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* **6**: 78-95, 2010. doi:10.1007/s11306-009-0178-y.
- Sakagami, H.; Shi, H.; Bandow, K.; Tomomura, M.; Tomomura, A.; Horiuchi, M.; Fujisawa, T.; Oizumi, T.: Search of neuroprotective polyphenols using the "Overlay" isolation method. *Molecules* **23**: 2018. doi:10.3390/molecules23081840.
- Wang, Y.; Kang, W.; Shang, L.; Song, A.; Ge, S. N-WASP knockdown upregulates inflammatory cytokines expression in human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* **110**: 2020. 104605, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104605.
- Ara, T.; Sogawa, N.: Effects of shinbuto and ninjinto on prostaglandin E(2) production in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. *PeerJ* **5**: e4120, 2017. doi:10.7717/peerj.4120.
- Kato, T.; Segami, N.; Sakagami, H.: Anti-inflammatory activity of hangeshashinto in IL-1 $\beta$ -stimulated gingival and periodontal ligament fibroblasts. *In Vivo* **30**: 257-263. 2016.
- Suzuki, S.; Kodera, Y.; Saito, T.; Fujimoto, K.; Momozono, A.; Hayashi, A.; Kamata, Y.; Shichiri, M.: Methionine sulfoxides in serum

- proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Sci Rep* **6**: 38299, 2016. doi:10.1038/srep38299.
17. Holte, K.B.; Svantesson, M.; Hanssen, K.F.; Sveen, K.A.; Seljeflot, I.; Solheim, S.; Sell, D.R.; Monnier, V.M.; Berg, T.J.: Collagen methionine sulfoxide and glucuronidine/LW-1 are markers of coronary artery disease in long-term survivors with type 1 diabetes. The Dialong study. *PLoS One* **15**: e0233174, 2020. doi:10.1371/journal.pone.0233174.
  18. Aledo, J.C.; Aledo, P.: Susceptibility of protein methionine oxidation in response to hydrogen peroxide treatment-ex vivo versus in vitro: A computational insight. *Antioxidants (Basel)* **9**: 2020. doi:10.3390/antiox9100987.
  19. Sourdon, J.; Keceli, G.; Lindsey, M.L.; Paolucci, N.: Death of an antioxidant brings heart failure with preserved ejection fraction to life: 5-oxoproline and post-ischaemic cardio-renal dysfunction. *Cardiovasc Res* **114**: 1819-1821, 2018. doi:10.1093/cvr/cvy239.
  20. van der Pol, A.; Gil, A.; Tromp, J.; Silljé, H.H.W.; van Veldhuisen, D.J.; Voors, A.A.; Hoendermis, E.S.; Grote Beverborg, N.; Schouten, E.M.; de Boer, R.A., *et al.*: OPLAH ablation leads to accumulation of 5-oxoproline, oxidative stress, fibrosis, and elevated fillings pressures: a murine model for heart failure with a preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* **114**: 1871-1882, 2018. doi:10.1093/cvr/cvy187.
  21. Bachhawat, A.K.; Yadav, S.; Jainarayanan, A.K.; Dubey, P.: Heart failure and the glutathione cycle: an integrated view. *Biochem J* **477**: 3123-3130, 2020. doi:10.1042/bcj20200429.
  22. Gut, P.; Verdin, E.: The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* **502**: 489-498, 2013. doi:10.1038/nature12752.
  23. Zamaraeva, M.V.; Sabirov, R.Z.; Maeno, E.; Ando-Akatsuka, Y.; Bessonova, S.V.; Okada, Y.: Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ* **12**: 1390-1397, 2005. doi:10.1038/sj.cdd.4401661.
  24. Basso, F.G.; Pansani, T.N.; Turrioni, A.P.; Soares, D.G.; de Souza Costa, C.A.; Hebling, J.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, Delaying wound healing. *J Periodontol* **87**: 990-996, 2016. doi:10.1902/jop.2016.150713.
  25. Vardar-Sengul, S.; Arora, S.; Baylas, H.; Mercola, D.: Expression profile of human gingival fibroblasts induced by interleukin-1beta reveals central role of nuclear factor-kappa B in stabilizing human gingival fibroblasts during inflammation. *J Periodontol* **80**: 833-849, 2009. doi:10.1902/jop.2009.080483.
  26. Song, H.K.; Noh, E.M.; Kim, J.M.; You, Y.O.; Kwon, K.B.; Lee, Y.R.: Reversine inhibits MMP-3, IL-6 and IL-8 expression through suppression of ROS and JNK/AP-1 activation in interleukin-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* **2019**, 108, 104530, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104530.
  27. Kim, S.; Ahn, S.H.; Lee, J.S.; Song, J.E.; Cho, S.H.; Jung, S.; Kim, S.K.; Kim, S.H.; Lee, K.P.; Kwon, K.S., *et al.*: Differential matrix metalloprotease (MMP) expression profiles found in aged gingiva. *PLoS One* **11**: e0158777, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0158777.
  28. Hosokawa, Y.; Hosokawa, I.; Ozaki, K.; Nakae, H.; Matsuo, T.: Proinflammatory effects of tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* **146**: 540-549, 2006. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03233.x.
  29. Hosokawa, Y.; Hosokawa, I.; Ozaki, K.; Nakae, H.; Matsuo, T.: Oncostatin M synergistically induces CXCL10 and ICAM-1 expression in IL-1beta-stimulated-human gingival fibroblasts. *J Cell Biochem* **111**: 40-48, 2010. doi:10.1002/jcb.22648.
  30. Sakagami, H.; Amano, S.; Kikuchi, H.; Nakamura, Y.; Kuroshita, R.; Watanabe, S.; Satoh, K.; Hasegawa, H.; Nomura, A.; Kanamoto, T., *et al.*: Antiviral, antibacterial and vitamin C-synergized radical-scavenging activity of *Sasa senanensis* Rehder extract. *In Vivo* **22**: 471-476, 2008.
  31. Sakagami, H.; Fukuchi, K.; Kanamoto, T.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Natori, T.; Suguro-Kitajima, M.; Oizumi, H.; Yasui, T.; Oizumi, T.: Synergism of alkaline extract of the leaves of *Sasa senanensis* Rehder and antiviral agents. *In Vivo* **30**: 421-426, 2016.
  32. Sakagami, H.; Kushida, T.; Oizumi, T.; Nakashima, H.; Makino, T.: Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine. *Pharmacol Ther* **128**: 91-105, 2010. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.05.004.
  33. Sakagami, H.; Nagata, K.; Ishihama, A.; Oh-hara, T.; Kawazoe, Y.: Anti-influenza virus activity of synthetically polymerized phenylpropenoids. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 1267-1272, 1990. doi:10.1016/0006-291x(90)91586-h.
  34. Nakashima, H.; Murakami, T.; Yamamoto, N.; Naoe, T.; Kawazoe, Y.; Konno, K.; Sakagami, H.: Lignified materials as medicinal resources. V. Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of some synthetic lignins. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **40**: 2102-2105, 1992. doi:10.1248/cpb.40.2102.
  35. Harada, H.; Sakagami, H.; Nagata, K.; Oh-hara, T.; Kawazoe, Y.; Ishihama, A.; Hata, N.; Misawa, Y.; Terada, H.; Konno, K.: Possible involvement of lignin structure in anti-influenza virus activity. *Antiviral Res* **15**: 41-49, 1991. doi:10.1016/0166-3542(91)90039-t.
  36. Fukuchi, K.; Sakagami, H.; Ikeda, M.; Kawazoe, Y.; Oh-Hara, T.; Konno, K.; Ichikawa, S.; Hata, N.; Kondo, H.; Nonoyama, M.: Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances. *Anticancer Res* **9**: 313-317, 1989.
  37. Fukuchi, K.; Sakagami, H.; Okuda, T.; Hatano, T.; Tanuma, S.; Kitajima, K.; Inoue, Y.; Inoue, S.; Ichikawa, S.; Nonoyama, M., *et al.*: Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res* **11**: 285-297, 1989. doi:10.1016/0166-3542(89)90038-7.
  38. Sakagami, H.; Satoh, K.; Ida, Y.; Koyama, N.; Premanathan, M.; Arakaki, R.; Nakashima, H.; Hatano, T.; Okuda, T.; Yoshida, T.: Induction of apoptosis and anti-HIV activity by tannin- and lignin-related substances. *Basic Life Sci* **66**: 595-611, 1999. doi:10.1007/978-1-4615-4139-4\_33.
  39. Fukai, T.; Sakagami, H.; Toguchi, M.; Takayama, F.; Iwakura, I.; Atsumi, T.; Ueha, T.; Nakashima, H.; Nomura, T.: Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* **20**: 2525-2536, 2000.

---

# ビタミン A 誘導体による 時計遺伝子・血糖調節遺伝子の発現制御

三崎 紀展 (MISAKI Toshinori)<sup>1,2</sup>, 林 桃子 (HAYASHI Momoko)<sup>3,4</sup>,  
高木 勝広 (TAKAGI Katsuhiko)<sup>2,4</sup>, 山田 一哉 (YAMADA Kazuya)<sup>2,4,\*</sup>

---

Key Words: レチノイン酸, 時計遺伝子, 血糖調節, 肝細胞, SHARP, PEPCK

## Regulation of expression of the clock gene and blood glucose control gene by a vitamin A derivative

**Authors:** Toshinori Misaki<sup>1,2</sup>, Momoko Hayashi<sup>3,4</sup>, Katsuhiko Takagi<sup>2,4</sup>, and Kazuya Yamada<sup>2,4,\*</sup>

\***Corresponding author:** Kazuya Yamada<sup>2,4</sup>

### Affiliated institutions:

<sup>1</sup> College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University [2-1723 Oomori Moriyama, Nagoya, Aichi, 463-8521, Japan]

<sup>2</sup> Department of Health and Nutritional Science, Faculty of Human Health Science, Matsumoto University  
[2095-1 Niimura, Matsumoto, Nagano 390-1295, Japan]

<sup>3</sup> Department of Metabolic Regulation, Shinshu University Graduate School of Medicine, Science and Technology  
[3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan]

<sup>4</sup> Matsumoto University Graduate School of Health Science  
[2095-1 Niimura, Matsumoto, Nagano 390-1295, Japan, Phone: +81-263-48-7321]

Key Words: Retinoic acid, Clock gene, Blood glucose regulation, Hepatocyte, SHARP, PEPCK

### Abstract

Retinoic acid, a vitamin A derivative, not only plays an important role in morphogenesis during development, but also plays multiple roles in epithelial homeostasis and immune regulation in the adults. At the cellular level, retinoic acid functions as a ligand for nuclear receptors and is known to regulate the expression of many genes, but biochemical analysis of individual gene expression is still not understood. Our group has studied the SHARP family of transcription factors, which is one of the clock genes regulating circadian rhythms and the blood glucose level. Mouse SHARP-2 was originally cloned as a gene whose expression is upregulated in P19 embryonal carcinoma cells during retinoic acid-induced neuronal differentiation. However, the effect of retinoic acid on SHARP-2 expression in differentiated cells has not been clarified. In order to better understand the physiological function of retinoic acid and its role in the mechanism of transcriptional activation, we will discuss the possibility that retinoic acid is involved in the regulation of the expression of clock genes and blood glucose regulatory genes, including the results of our recent study on the effect of retinoic acid on the expression of the *SHARP family* genes in differentiated hepatocytes.

---

\* 責任著者: 山田一哉 (Kazuya Yamada)<sup>2,4</sup> e-mail:k.yamada@t.matsu.ac.jp

<sup>1</sup> 金城学院大学薬学部薬学科 (〒 463-8521 愛知県名古屋市守山区大森 2-1723)

<sup>2</sup> 松本大学人間健康学部健康栄養学科 (〒 390-1295 長野県松本市新村 2095-1)

<sup>3</sup> 信州大学大学院総合医理工学研究科代謝制御学 (〒 390-8621 長野県松本市旭 3-1-1)

<sup>4</sup> 松本大学大学院健康科学研究科 (〒 390-1295 長野県松本市新村 2095-1)

## 要旨

ビタミン A 誘導体の一つであるレチノイン酸は、発生段階の形態形成で重要な役割を果たすだけでなく、成体でも上皮の恒常性や免疫制御など多面的な役割を果たしている。細胞レベルでは、レチノイン酸は核内受容体のリガンドとして機能し、数多くの遺伝子の発現を制御することが知られているが、個々の遺伝子発現に対する生化学的な解析は未だ十分でない。私たちのグループでは概日リズムを刻む時計遺伝子の一つであり、血糖調節作用に関与する転写因子 SHARP ファミリーについて研究を行ってきた。マウス SHARP-2 は、もともと胚性がん細胞 P19 のレチノイン酸による神経細胞への分化誘導時に、発現が上昇する遺伝子としてクローニングされているが、分化した細胞における SHARP-2 発現に対するレチノイン酸の影響は明らかにされていない。本稿では、レチノイン酸の生理機能および転写活性化作用機序における役割について理解を深めるために、高分化型肝細胞株においてレチノイン酸が SHARP ファミリー遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した最新の研究内容も含めて、レチノイン酸が時計遺伝子や血糖調節遺伝子の発現調節に関わる可能性について論述する。

## はじめに

ビタミン A は 20 世紀前半に発見された栄養素で、脂溶性ビタミンの一種であり、ヒトは体内合成できないため食事によって摂取する必要がある<sup>1)</sup>。また、主に植物性食品に含まれるカロテン（特にβ-カロテン）やクリプトキサンチンはプロビタミン A と総称されており、摂取されると体内でビタミン A に変換される。ビタミン A は一般的にレチノールのことを指すが、体内ではレチノール、レチナール、レチノイン酸 (RA) として存在する。視覚、生殖、上皮の成長、血管新生、コラーゲン合成など多くの生理機能に寄与することが知られており、欠乏すると夜盲症や貧血、皮膚の角質化などを引き起こす<sup>2,4)</sup>。

中でも RA は高い生理活性を有し、脊索動物の発生を制御している。マウスやゼブラフィッシュの胚を用いた遺伝学的研究により、体軸、脊髄、前肢、心臓、眼球、生殖管など、多くの器官や組織の発生を制御していることが示されている<sup>5)</sup>。さらに生体の恒常性を維持する上でも細胞増殖や免疫制御など多面的な役割が明らかになっている<sup>6)</sup>。また、皮膚疾患や白血病細胞の分化誘導法に応用されて化粧品や治療薬としても利用されている<sup>7)</sup>。一般的に RA は核内受容体のリガンドとして機能して、遺伝子の転写を活性化したり抑制したりすることで生理活性を発揮する<sup>8)</sup>。

マウス SHARP-2 は、もともと RA による胚性がん細胞 P19 の神経細胞への分化誘導時に、発現が上昇する遺伝子としてクローニングされた<sup>9)</sup>。SHARP-2 は概日リズムを刻む時計遺伝子の一つであり、血糖調節にも関与する転写因子である<sup>10-12)</sup>。しかしながら、分化した細胞における SHARP-2 発

現に対する RA の影響は明らかでない。ここでは高分化型肝細胞株での RA の作用として、SHARP ファミリー時計遺伝子発現の調節について検討した研究を紹介するとともに、RA の血糖調節遺伝子の発現に対する役割について理解を深めたい。

## 1. ビタミン A の生理活性と RA の作用機序

### 1-1. ビタミン A の生理活性

ヒトではビタミン A の約 80% 以上が肝臓に貯蔵されており、その多くはエステル化されたレチノール (アルコール体) で星細胞に内包されている<sup>13,14)</sup>。生命活動における代謝活性はレチノールでは低く、レチノールは可逆的に酸化されてレチナール (アルデヒド体) となり、さらにレチナールは不可逆的に酸化されて最も代謝活性が高いレチノイン酸 (RA) となる。これらはタンパク質と結合して安定化したのち、必要に応じて血液を通じて全身に運ばれて、視覚、生殖、線維芽細胞、肉芽組織、血管新生、コラーゲン合成、皮膚・粘膜上皮のターンオーバーなど多様な生理作用をもつ。中でも RA は発生過程においては濃度依存的な形態形成因子 (モルフォゲン) としての機能を持ち、正常な胚発生に必須の働きをもつことが知られている<sup>5)</sup>。成体においてもシグナル誘導因子として細胞増殖や免疫系など様々な組織の恒常性に必要であることが明らかとなっており、現在でも多くの研究が行われている。これまでに 500 種以上の遺伝子が、RA の直接的または間接的な制御標的として提唱されている<sup>15)</sup>。

### 1-2. RA の受容体と作用機序

RA は、2つの核内受容体であるレチノイン酸受

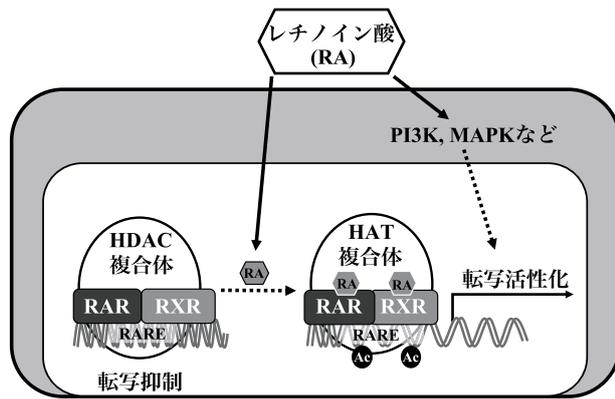


図1 レチノイン酸による転写活性化機構

容体 (RAR) とレチノイド X 受容体 (RXR) を媒介して作用することが知られている。RAR と RXR にはそれぞれに  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  という3つのメンバーが存在する<sup>16)</sup>。ヘテロ2量体として核内受容体を構成することが多いが、RXRはホモ2量体または他の受容体とヘテロ2量体を形成することもある。RAが結合したRAR/RXRまたはRXR/RXRは、標的遺伝子の転写調節領域に存在する特定のDNA配列である、レチノイン酸応答エレメント (RARE) と呼ばれる領域へ特異的に結合することで転写活性化因子として機能する。RA非存在下では、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を含む複合体が集積することで、標的遺伝子の転写は抑制されている。RA存在下では、これら転写抑制複合体の解離と同時に、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) を含む転写活性化因子が集積し、クロマチン構造が弛緩することで転写因子が結合しやすくなり転写が活性化される (図1)<sup>17,18)</sup>。

### 1-3. RAによる非ゲノム作用機序

RAによる転写制御作用には核内受容体を介したゲノム経路と呼ばれる直接的な経路とは別に、細胞種特異的にリン酸化シグナル伝達経路を活性化する非ゲノム経路を介することがある。白血病細胞、マウス胚性がん細胞、繊維芽細胞などではp38分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (p38MAPK) が活性化される<sup>19)</sup>。また、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) 経路やRAR/RXRのリン酸化を介したシグナルなども活性化することが知られている<sup>20)</sup>。これらのシグナルがどのように使い分けられているのか完全には解明されておらず、RAの効果を評価する際には核内受容体とは独立した転

写制御も存在することを考慮する必要がある。

## 2. RAによる時計遺伝子の発現制御

### 2-1. SHARPファミリー時計遺伝子

SHARPファミリーは、概日リズムの調節や代謝に関わるbasic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子であり、SHARP-1 (DEC2/BHLHB3/BHLHE41) およびSHARP-2 (DEC1/BHLHB2/Stra13/BHLHE40)の2種類のアイソフォームが存在する<sup>21,22)</sup>。SHARPタンパク質は核に局在し、互いにホモまたはヘテロ2量体を形成してE-box配列 (5'-CANNTG-3') に結合することにより標的遺伝子の転写を抑制する<sup>23,24)</sup>。また他のタンパク質との結合を介した相互作用も行っている<sup>25,26)</sup>。

概日リズムは視交叉上核および末梢組織において時計遺伝子CLOCKおよびBMAL1が中核として様々な遺伝子発現を調節することで成り立っている<sup>27)</sup>。その遺伝子産物であるCLOCK/BMAL1はPer, Cry, SHARP遺伝子のプロモーター上に存在するE-box配列に結合して発現を亢進させる。一方、これらの因子はCLOCK/BMAL1の活性を抑える働きをもつため、フィードバックループによってリズムが形成される。SHARPはE-box配列への競合的結合またはBMAL1との直接の結合を介してその活性を抑制している<sup>28,29)</sup>。SHARP遺伝子欠損のマウスではグルコース代謝リズムを含む概日リズムが異常になることからSHARPは概日リズム調節を司る時計遺伝子として機能していると言える<sup>30,31)</sup>。

### 2-2. RAによるSHARPファミリー遺伝子の発現制御

ラット高分化型肝細胞株H4IIE細胞におけるSHARPファミリー遺伝子の発現に対するRAの作用について検討した。RA処理によりSHARP-1 mRNA量はほとんど変化しなかったが、SHARP-2 mRNA量は用量依存的に増加した。また、SHARP-2 mRNA量は0.5時間後から上昇し、1時間後にピークに達し、4時間後にも上昇していた。従って、H4IIE細胞では、RAによりSHARPファミリーのうちSHARP-2 mRNAの発現だけが迅速かつ一時的に誘導されることが明らかになった (表1)<sup>32)</sup>。

SHARPファミリー遺伝子は、概日リズムを制御している。血清中のグルココルチコイド濃度は、概

表 1 H4IIE 細胞におけるレチノイン酸やホルモンによる SHARP ファミリー mRNA の発現量変化<sup>32)</sup>

	RA	Dex	Insulin	RA/Dex	RA/Insulin
SHARP-1	変化なし	変化なし	+	変化なし	+
SHARP-2	++	変化なし	+	+	+++

日リズムで制御されている<sup>33)</sup>。また、インスリンは食事の摂取により日内で分泌が変動するホルモンである<sup>4)</sup>。そこで、RA の存在下で、SHARP ファミリー遺伝子の発現が、グルココルチコイド作用をもたらす合成副腎皮質ステロイド剤であるデキサメタゾン (Dex) またはインスリンにより変化するかどうか検討した。Dex 単独では、SHARP-1 および SHARP-2 の mRNA 量に影響を与えなかった<sup>32)</sup>。しかし、興味深いことに、RA による SHARP-2 mRNA の発現は、Dex の存在下で有意に減少した (表 1)。すなわち、Dex の作用は RA の存在下、非存在下で異なることが明らかになった。インスリンは、これまでに報告されているように、SHARP-1 と SHARP-2 の両方の mRNA の発現を誘導した<sup>22,23)</sup>。インスリンによって誘導された SHARP-1 mRNA の発現は、RA の存在下ではほとんど影響を受けなかったが、RA によって誘発された SHARP-2 mRNA の発現は、インスリンの存在下でさらに増加した (表 1)。

**2-3. RA による SHARP-2 遺伝子の発現誘導シグナル伝達経路**

RA は、前述の通り様々なシグナル分子を介して直接的または間接的に作用することが報告され

ている<sup>18-20)</sup>。そこで、RA による SHARP-2 mRNA の発現誘導にどのような経路が関与しているか検討するために、いくつかのシグナル分子の阻害剤で前処理を行った。RA による SHARP-2 mRNA の発現誘導は、主として PI3K 経路の阻害剤である LY294002, protein kinase C (PKC) の阻害剤である staurosporine, RNA polymerase II の阻害剤である actinomycin D で阻害された。一方、翻訳阻害剤である cycloheximide では阻害されなかった。したがって、RA による SHARP-2 mRNA の発現誘導は、主に、PI3K 経路や PKC 経路を介して SHARP-2 遺伝子の転写レベルで生じ、誘導には新規タンパク質の合成は不要であることが明らかになった (図 2)<sup>32)</sup>。

**2-4. SHARP-2 遺伝子の転写活性に対する RAR/RXR の効果**

RA の一般的な作用機序は、核内受容体である RAR/RXR を介した直接的な経路であるため、RA が SHARP-2 遺伝子の転写調節領域に影響するかどうかを調べるために、SHARP-2 プロモーター活性を測定した<sup>17,18)</sup>。RAR/RXR 発現プラスミドと SHARP-2 遺伝子の転写開始点上流 3,700 bp までの領域を含む SHARP-2/Luc-3700 レポータープラスミ

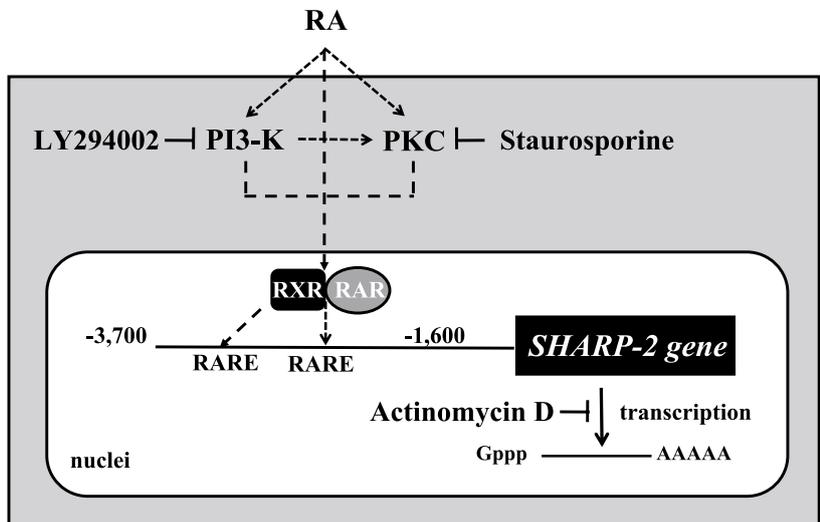


図 2 レチノイン酸による SHARP-2 遺伝子の転写活性化機構<sup>32)</sup>

ドをヒト肝がん細胞株 HepG2 細胞に形質導入し、RA で処理したところ、*SHARP-2* 遺伝子の転写活性は増加した。さらに *SHARP-2* 遺伝子プロモーター上の RARE を同定するために、上流 2,500 bp, 2,200 bp, 1,600 bp までを含む様々な 5'-deletion コンストラクトを用いた。その結果、*SHARP-2* 遺伝子の上流 3,700 bp ~ 2,500 bp および 2,200 bp ~ 1,600 bp の間に少なくとも 2 つの RARE が存在することが示唆された (図 2) <sup>32)</sup>。

### 3. RA による血糖調節遺伝子の発現制御

#### 3-1. 肝臓での糖代謝に対する RA の効果

肝臓は栄養素やホルモンの刺激によって、グルコースからグリコーゲンや脂肪を合成したり、内因性の非炭水化物源から糖新生を行い、グルコースを血中へ放出することにより、血糖を調節している <sup>4)</sup>。肝臓での糖代謝におけるビタミン A の役割は古くから示唆されている。例えば、糖尿病で亡くなった患者の肝臓にはビタミン A 含有量の増加が見られた <sup>34)</sup>。また、ラットにビタミン A を含まない食餌を与えると肝グリコーゲン量が減少する一方、過剰のビタミン A を含む食餌を与えると肝グリコーゲン量が上昇したことが報告されている <sup>35)</sup>。実際、RA が糖代謝に及ぼす遺伝子制御としては、ラット初代培養肝細胞において、解糖の第一段階でグルコースからグルコース -6-リン酸を生成する際に必要となるグルコキナーゼ (*GK*) 遺伝子や、糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カ

ルボキシナーゼ (*PEPCK*) 遺伝子の転写が亢進されることが報告されている <sup>36)</sup>。興味深いことに、*GK* と *PEPCK* の活性はそれぞれ異なる生理的条件下で誘導されるべき因子であると考えられているにも関わらず、RA は両遺伝子の転写を活性する作用を持つ。少なくとも肝臓にインスリンが作用した場合、血糖値を下げるため、*GK* を活性化することで解糖を促進し、反対に *PEPCK* を不活性化することで糖新生を抑制する <sup>37)</sup>。RA による肝臓での糖代謝における役割については他のホルモンの働きとの相関も含めてさらなる成果が求められる。

#### 3-2. *PEPCK* 遺伝子の発現制御

*PEPCK* は糖新生の律速酵素であり、その酵素活性をアロステリック制御する因子は同定されておらず、*PEPCK* の mRNA やタンパク質の半減期は極端に短いため、*PEPCK* 発現量の増減によって糖新生の活性は調節されている <sup>38)</sup>。それゆえ *PEPCK* 遺伝子の転写制御については詳しく解析がなされており、シグナル系によって大別できる。発現を亢進するグルココルチコイド応答性ユニット (GRU)、サイクリック AMP 応答性ユニット (CRU)、RA 応答性ユニット (RARU)、甲状腺ホルモン応答性ユニット (TRU)、ならびに、これらの発現誘導に対して優位に抑制的な作用をするインスリン応答性ユニット (IRU) である。それぞれ関与する複数の転写制御因子およびその結合部位も同定されている (図 3) <sup>39,40)</sup>。RARU では、RAR/RXR が結合

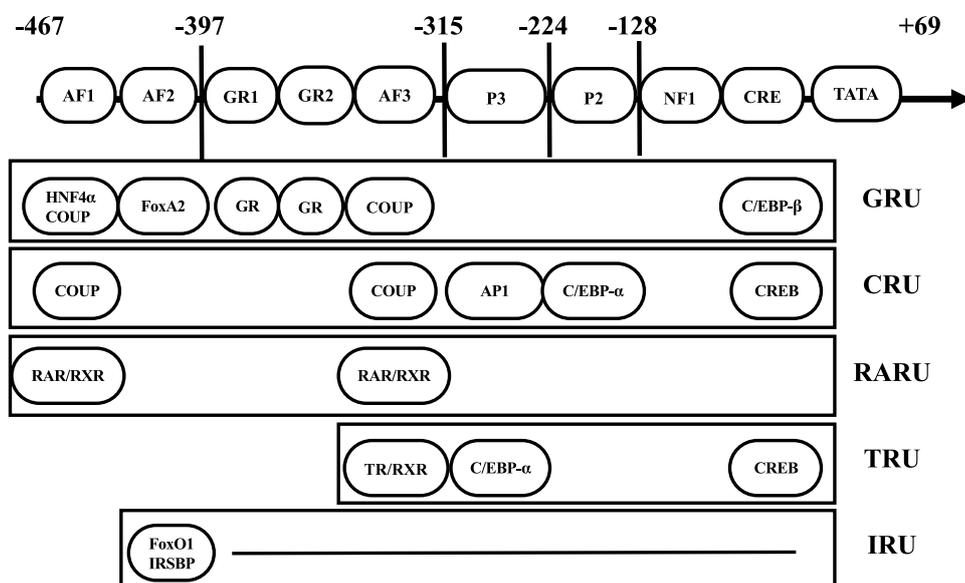


図 3 ラット *PEPCK* 遺伝子の発現調節領域 <sup>39)</sup>

する RARE が2箇所同定されている<sup>41)</sup>。同じ領域にはシグナルによって HNF4 $\alpha$  や核内受容体 COUP-TF が結合することもある。このように多数の因子が *PEPCK* 遺伝子の発現を制御することが明らかになっている。

### 3-3. RA による *PEPCK* 遺伝子の発現制御

*SHARP-2* 遺伝子と同様に、RA と他のシグナルが協調して *PEPCK* 遺伝子の発現を制御するかどうか検討した。H4IIE 細胞を RA で処理すると *PEPCK* mRNA は高発現し、Dex 処理においても発現上昇した (図4)。一方、インスリン処理により *PEPCK*

mRNA 量は大きく減少した。RA によって誘導された *PEPCK* mRNA 発現は Dex 存在下で相乗的に増加したが、インスリン存在下では RA による発現誘導は顕著に低下した (図4)。したがって、RA と Dex は相乗効果をもたらすこと、RA とインスリンは拮抗的に *PEPCK* mRNA 発現を制御していることが明らかになった。RAR/RXR による亢進的な作用と FoxO1 の解離や *SHARP* による抑制的な作用がどのようにクロマチン状態を変化させ、*PEPCK* 遺伝子のプロモーター活性を制御しているのかは今後の興味深い検討課題である。

さらに、RA による *PEPCK* mRNA の発現誘導

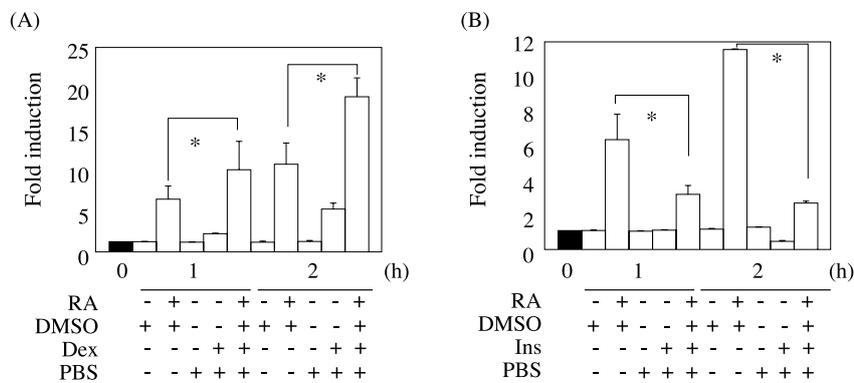


図4 H4IIE 細胞におけるレチノイン酸やホルモンによる *PEPCK* mRNA の発現量変化

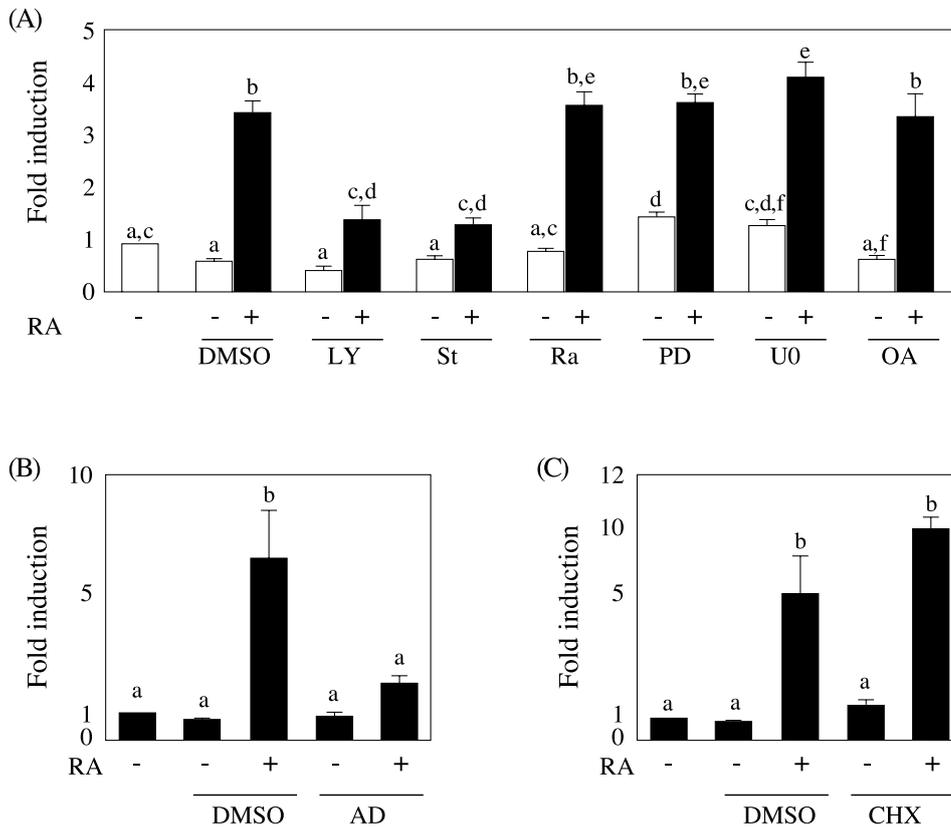


図5 レチノイン酸による *PEPCK* mRNA の発現誘導に関するシグナル伝達経路の解析

にどのような経路が関与しているかを検討するために、いくつかのシグナル分子の阻害剤で前処理を行った。RAによるPEPCK mRNAの発現誘導はSHARP-2 mRNAの発現誘導時と同様に、LY294002, staurosporine および actinomycin Dで阻害されたが、cycloheximideでは阻害されなかった。したがって、RAによるPEPCK mRNAの発現誘導は、主に、PI3K経路やPKC経路を介してPEPCK遺伝子の転写レベルで生じ、誘導には新規タンパク質の合成は不要であることが明らかになった(図5)。

### おわりに

RAによる時計遺伝子の制御と、血糖調節遺伝子の制御について最新の知見を交えて論述した。RAは分化した肝細胞において、複数のシグナル経路を使ってSHARP-2 mRNAの発現を亢進した。この場合、RAは古典的な核内受容体を介した経路だけでなく、PI3K経路、PKC経路などを活性化することでSHARP-2遺伝子の転写を誘導した。SHARP-2遺伝子の発現に関して、RAはインスリンとは協調的に働き、さらに発現上昇したが、Dexには抑制的な制御を受けた。

PEPCK遺伝子の発現に関しても、RAはDexの

作用を増強し、インスリン作用にも応答した。そのシグナル伝達経路もSHARP-2とPEPCKでは共通していた。これらの結果から、RAは肝細胞の分化状態を支持し、ホルモンに対する感受性を高めている可能性が考えられる。インスリンはSHARP-2遺伝子の発現を上昇させ、PEPCK遺伝子の発現を低下させるが、RAはSHARP-2遺伝子とPEPCK遺伝子の発現を上昇させる。SHARP-2とPEPCKの関係は矛盾しているように見えるが、RAの肝細胞の分化状態の支持という作用を考えると、インスリン単独刺激時のPEPCK遺伝子に対するSHARP-2の作用とは異なることが考えられる。実際、RAとインスリンが作用するときのPEPCK遺伝子のプロモーターに作用する転写因子は異なっている(図3)。また、SHARPは核内受容体RXRと直接相互作用してその活性を抑制するという報告がある<sup>43)</sup>。過剰なRAシグナルは、細胞が分化状態を保てなくなり奇形性やアポトーシスを引き起こすことから、SHARP-2の発現誘導により、RXRの抑制を介してRAによる過剰な転写活性から保護していることも考えられる。今後、RAの作用に対する全体像を明らかにするために、より詳細な研究の発展が望まれる。

### 参考文献

1. Samba, R. D.: The discovery of the vitamins. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **82**: 310-315, 2012.
2. Canete, A., Cano, E., Munoz-Chapuli, R., and Carmona, R.: Role of vitamin A/retinoic acid in regulation of embryonic and adult hematopoiesis. *Nutrients* **9**: 159, 2017.
3. Szymanski, L., Skopek, R., Palusinska, M., Schenk, T., Stengel, S., et al.: Retinoic acid and its derivatives in skin. *Cells* **9**: 2660, 2020.
4. Guoxun, C.: Role of vitamin A metabolism in the development of hepatic insulin resistance. *ISRN Hepatol.* **2013**: 534972, 2013.
5. Ghyselinck, N.B. and Duester, G.: Retinoic acid signaling pathways. *Development* **146**: dev167502, 2019.
6. Raverdeau, M. and Mills, K. H.: Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic acid. *J. Immunol.* **192**: 2953-2958, 2014.
7. Altucci, L. and Gronemeyer, H.: The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 181-193, 2001.
8. Schenk, T., Stengel, S., and Zelent, A.: Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. *Br. J. Cancer* **111**: 2039-2045, 2014.
9. Boudjelal, M., Taneja, R., Matsubara, S., Bouillet, P., Dolle, P., et al.: Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev.* **11**: 2052-2065, 1997.
10. Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Noguchi, T., et al.: Insulin induces the expression of the SHARP-2/Stra13/DEC1 gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **278**: 30719-30724, 2003.
11. Grechez-Cassiau, A., Panda, S., Lacoche, S., Teboul, M., Azmi, S., et al.: The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J. Biol. Chem.* **279**: 1141-1150, 2004.
12. Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., et al.: The rat enhancer of split- and hairy- related protein -2 gene: hepatic expression, genomic structure, and promoter analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**: 81-90, 2004.
13. Alapatt, P., Guo, F., Komanetsky, S. M., Wang, S., Cai, J., et al.: Liver retinol transporter and receptor for serum retinol-binding protein (RBP4). *J. Biol. Chem.* **288**: 1250-1265, 2013.
14. Dawson, H. D., Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., Rosales, F. J., Dietz, J., et al.: Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J. Nutr.* **130**: 1280-1286, 2000.
15. Balmer, J. E. and Blomhoff, R.: Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* **43**: 1773-1808, 2002.

16. McKenna, N. J.: EMBO Retinoids 2011: Mechanisms, biology and pathology of signaling by retinoic acid and retinoic acid receptors. *Nucl. Recept. Signal* **10**: e003, 2012.
17. Watson, P. J., Fairall, L., and Schwabe, J. W. R.: Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **348**: 440-449, 2012.
18. Clagett-Dame, M. and Knutson D.: Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* **3**: 385-428, 2011.
19. Piskunov, A. and Rochette-Egly, C.: A retinoic acid receptor RAR $\alpha$  pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein  $\alpha$  Q to activate p38MAPK. *Oncogene* **31**: 3333-3345, 2012.
20. Kumar, S. and Duyster, G.: SnapShot: retinoic acid signaling. *Cell* **147**: 1422-1422.e1, 2011.
21. Yamada, K. and Miyamoto, K.: Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front Biosci.* **10**: 3151-3171, 2005.
22. Rossner, M. J., Dorr, J., Gass, P., Schwab, M. H., and Nave, K. A.: SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**: 460-475, 1997.
23. Takagi, K., Asano, K., Haneishi, A., Ono, M., Komatsu, Y., *et al.*: Insulin stimulates the expression of the *SHARP-1* gene via multiple signaling pathways. *Horm. Metab. Res.* **46**: 397-403, 2014.
24. Kanai, Y., Asano, K., Komatsu, Y., Takagi, K., Ono, M., *et al.*: Induction of the SHARP-2 mRNA level by insulin is mediated by multiple signaling pathways. *Biosci. Biotech. Biochem.* **81**: 256-261, 2017.
25. 塚田晃子, 高木勝広, 山田一哉: インスリン誘導性 *SHARP-1* 遺伝子と *SIRT1* 長寿遺伝子の発現相関. *New Food Industry* **62**: 339-345, 2020.
26. Asano, K., Tsukada, A., Takagi, K., and Yamada, K.: An insulin-inducible transcription factor, SHARP-1, represses transcription of the *SIRT1* longevity gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**: 1-6, 2020.
27. Hastings, M. H., Reddy, A. B., and Maywood, E. S.: A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 649-661, 2003.
28. Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., *et al.*: Dec1 and Dec2 are regulators of mammalian molecular clock. *Nature* **419**: 841-844, 2002.
29. Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Honda, K. K., *et al.*: Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur. J. Biochem.* **271**: 4409-4419, 2004.
30. Noshiro, M., Furukawa, M., Honma, S., Kawamoto, T., Hamada, T., *et al.*: Tissue-specific disruption of rhythmic expression of Dec1 and Dec2 in clock mutant mice. *J. Biol. Rhythm* **20**: 404-418, 2005.
31. Sato, F., Bhawal, U.K., Yoshimura, T., and Muragaki, Y.: DEC1 and DEC2 crosstalk between circadian rhythm and tumor progression. *J. Cancer* **7**: 153-159, 2016.
32. Hayashi, M., Misaki, T., Yoshida, S., Tokutake, H., Aruga, T., *et al.*: Retinoic acid stimulates transcription of the rat *SHARP-2* gene via multiple pathways. *J. Biochem.* doi: 10.1093/jb/mvab058. in press.
33. Cederroth, C. R., Park, J. S., Basinou, V., Weger, B. D., Tserga, E., *et al.*: Circadian regulation of cochlear sensitivity to noise by circulating glucocorticoids. *Curr. Biol.* **29**: 2477-2487.e6, 2019.
34. Moore, T.: Vitamin A and carotene: the vitamin A reserve of the adult human being in health and disease. *Biochem. J.* **31**: 155-164, 1937.
35. Zhang, Y., Li, R., Li, Y., Chen, W., Zhao, S., *et al.*: Vitamin A status affects obesity development and hepatic expression of key genes for fuel metabolism in Zucker fatty rats. *Biochem. Cell Biol.* **90**: 548-557, 2012.
36. Zhang, Y., Li, R., Chen, W., Li, Y., and Chen G.: Retinoids induced Pck1 expression and attenuated insulin-mediated suppression of its expression via activation of retinoic acid receptor in primary rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **355**: 1-8, 2011.
37. Chen G.: Liver lipid molecules induce PEPCK-C gene transcription and attenuate insulin action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**: 805-810, 2007.
38. Hanson, R. W. and Reshef, L.: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 581-611, 1997.
39. Granner, D. K., Wang, J.-C., and Yamamoto, K. R.: Regulatory actions of glucocorticoid hormones: from organisms to mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **872**: 3-31, 2015.
40. O'Brien, R. M., Printz, R. L., Halmi, N., Tiesinga, J. J., and Granner D. K.: Structural and functional analysis of the human phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1264**: 284-288, 1995.
41. Shin, D.-J., Tao, A., and McGrane M. M.: Effects of vitamin A deficiency and retinoic acid treatment on expression of a phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone gene in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**: 706-714, 1995.
42. 塚田晃子, 高木勝広, 浅野公介, 山田一哉: インスリン誘導性時計遺伝子 *SHARP* ファミリーの発現調節機構. *New Food Industry* **59**: 1-10, 2017.
43. Cho, Y., Noshiro, M., Choi, M., Morita, K., Kawamoto, T., *et al.*: The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte (DEC) 1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors. *Mol. Pharmacol.* **76**: 1360-1369, 2009.

# 母乳の基礎知識

大谷 元 (OTANI Hajime) (信州大学 名誉教授)

Key Words: 母乳, 乳糖, 栄養機能, 感覚機能, 生体調節機能

本稿は、2011年に食品資材研究会より発刊された「母乳の力」に掲載された内容です。著者（大谷 元氏）の書き下ろしでもあり貴重な内容であるため、多くの方に読んでいただけるように本誌へ掲載することにしました。

## 1. 母乳で学ぶ食品の機能

食品の機能は、栄養機能（一次機能）、感覚機能（嗜好機能、二次機能）および生体調節機能（三次機能）に分けられます。これらの中でも生体調節機能を重視した食品を“機能性食品”と呼んでいます。

古くから“健康食品”という言葉があります。機能性食品と健康食品は、ともに健康の維持や増進を目的とした食品です。機能性食品は健康の維持や増進作用が科学的に実証された食品です。しかし、健康食品はそれらが科学的に実証されていない食品も含んでいます。

機能性食品の中でも、ヒトでの臨床試験により、その食品と疾病の関係が明確に立証されたことを法的に認めた食品を“特定保健用食品（トクホ）”と言います。機能性食品や健康食品に特定の保健の用途を表示して販売すると、薬事法により罰せられます。しかし、特定保健用食品は、その食品の持つ特定の保健の用途を表示することが許可された食品です。

食品の評価は、“栄養機能”から始まりました。しかし、今ではそれに、“感覚機能”と“生体調節機能”が加わって評価されます。成人は、多種多様な食品を摂取することで、それら3つの機能を満たしていると考えられます。

しかし、哺乳動物の新生児の食物は、

母乳しかありません。このことは、今の食品の評価法から考えると、母乳は、栄養機能、感覚機能、生体調節機能のすべてを満たしていません。言い換えますと、もし母乳が、それらの3つの機能を満たしていなければ、現在の食品の評価基準が間違っていることになります。

本項では、現在の食品の機能となっている栄養機能、感覚機能および生体調節機能が、食品の妥当な評価基準であることを母乳で検証します。

### (1) 栄養素の濃度

母乳中の栄養素の濃度は動物種により異なります。栄養素は、脂肪、タンパク質、糖質の三大栄養素と、ミネラルとビタミンの微量栄養素に分類されています。

表1-1に、ヒトと私たちのよく知る動物の母乳中のビタミン以外の栄養素の濃度を示しました。各動

表1-1 母乳の栄養素の濃度 (%)

動物種	固形分	脂肪	タンパク質	糖質	ミネラル
クジラ	51.8	34.8	13.6	1.8	1.6
シロクマ	42.9	31.0	10.2	0.5	1.2
イヌ	21.1	8.6	7.4	4.1	1.2
ブタ	19.2	7.6	5.9	4.8	0.9
ヤギ	12.1	3.7	3.3	4.3	0.8
ウシ	12.0	3.8	3.1	4.4	0.7
ウマ	10.1	1.3	2.1	6.3	0.4
ヒト	12.0	3.5	1.1	7.2	0.2

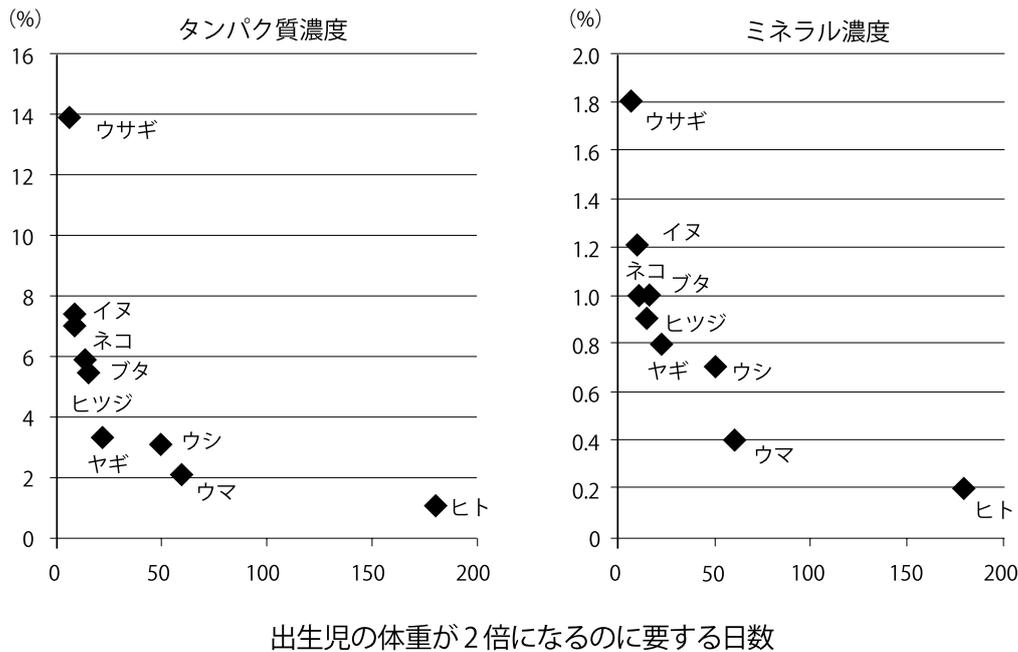


図 1-1 新生児の成長速度と母乳中のタンパク質とミネラル濃度の関係

物の母乳の栄養素濃度が、その動物の発育にとっていかに適しているかが考察できます。

すなわち、クジラやシロクマなどの水中や寒い地域で棲息する動物の母乳は、ヒトやイヌ、ブタやウシなどの家畜の母乳と比べて脂肪濃度が高く、糖質濃度が低くなっています。このことは、水中や寒い地域での生活はエネルギーの消費量が多く、エネルギーの生産効率のよい食物を摂取する必要があることに基づいています。クジラやシロクマなどの母乳には、重量当たりのエネルギー生産量が、糖質やタンパク質の2倍ある脂肪が多く含まれています。また、クジラのように水中で授乳する動物の脂肪濃度が高いことは、水中で母乳が拡散し難いという利点があります。

一方、哺乳動物の体は、細胞を構成単位とした組織、骨、歯、毛などで出来ています。細胞の固形物の約半分はタンパク質です。毛の主要成分はタンパク質で、骨と歯の主要成分はカルシウムやリンなどのミネラルとタンパク質です。これらのことは、哺乳動物の体の形成にはタンパク質とミネラルが重要であることを意味しています。

図 1-1 に示したように、母乳中のタンパク質濃度やミネラル濃度と、新生児の出生時の体重が2倍になるのに要する日数の間には、負の相関関係があります。これは、体重を早く増やすためにはタンパク質とミネラルを多く摂取しなければなら

ないからです。種属保存のための食物としての母乳中の栄養素は、その子孫の健全な発育のために相応しい濃度になっているのです。

このことは、日常生活において年齢や運動量を考慮した食生活をするのが大切であることを私たちに教えてくれています。

## (2) 脂肪の食品機能

脂肪という言葉で、お腹の周りの中性脂肪や豚肉の脂身をイメージする人が多いのではないのでしょうか。母乳中のほとんどの脂肪は中性脂肪です。しかし、それらは脂肪球として母乳中に分散しているために、豚肉の脂肪のように塊として見ることはありません。

母親の乳腺細胞で合成された乳脂肪は、母乳に移行するときに、母親の乳腺細胞の細胞膜や細胞質成分からなる膜（脂肪球皮膜と呼びます）で覆われます。

脂肪球皮膜は、水に溶けない中性脂肪、水にも油にも溶け易いリン脂質、油に溶けにくい糖タンパク質などから構成されています。そのために脂肪球は、図 1-2 に示したように、水に溶けにくい中性脂肪が内部に位置し、それをリン脂質や糖タンパク質が覆っています。脂肪球が皮膜で覆われることにより、母乳中で中性脂肪同志が重合することはなく、リン脂質や糖タンパク質などの表面に位置する水に溶け

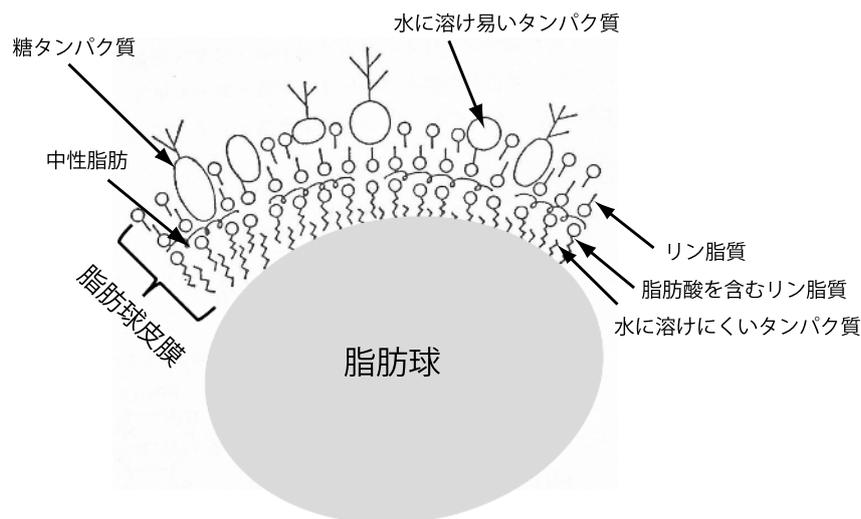


図 1-2 母乳の中性脂肪の存在状態

やすい物質により分散できます。

一般に球の表面積は、円柱や三角錐などの他の物体と比べて、最も大きいことから、母乳中の脂肪球の表面積は非常に大きくなっています。その結果、消化管で脂肪球は消化酵素のリパーゼと接する機会が多くなり、消化吸収性が高くなります。

すなわち、母乳中の脂肪は、脂肪球で存在することにより、栄養機能を満たし易くなっているのです。

なお、母乳の白っぽい色や母乳を飲んだときに感じるまろやかさは、脂肪に由来します。このことは、母乳の美味しさ、すなわち、感覚機能に脂肪が寄与していることを意味しています。また、母乳中の脂肪濃度は、1回の授乳時においても乳児の飲み始めは低く、後になるほど高くなります。このことは、母親の乳房の母乳量が少なくなることを乳児に知らせる役割を担っていると考えられています。

### (3) 糖質の食品機能

私たち成人が、主食としてのご飯やパンの主要糖質はデンプンです。しかし、母乳にデンプンは全く含まれていません。母乳の主要糖質は乳糖です。乳糖は人乳に約7.2%、牛乳に約4.4%含まれています。しかし、母乳以外で乳糖を含むものは自然界にはありません。

図 1-3 に、デンプンの部分構造と乳

糖の構造を示しました。デンプンは、多くの D-グルコースが  $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合で重合した多糖類です。一方、乳糖は、D-ガラクトースと D-グルコースが各々 1 分子  $\beta$ -1,4 結合で重合した二糖類です。

体内に取り込まれた乳糖は、1g 当たり 4 キロカロリーのエネルギーを生産します。そのために計算上は、人乳の生産する全エネルギーの約半分と、牛乳の生産するエネルギーの約 1/3 が乳糖に由来するものです。

デンプンや乳糖が体内でエネルギー源になるためには、消化管でグルコースやガラクトースなどの単糖に消化されなくてはなりません。デンプンを消化

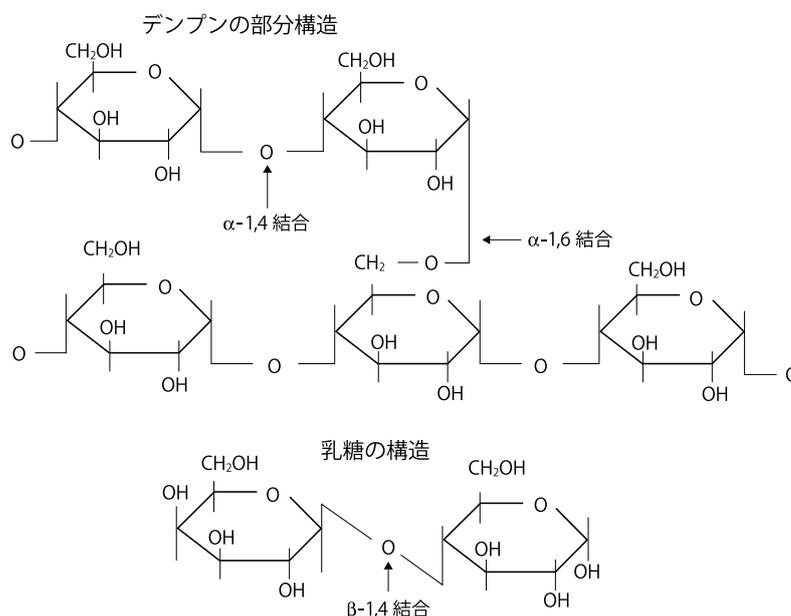


図 1-3 デンプンの部分構造と乳糖の構造

するアミラーゼは胎児期に多く作られ、新生児の消化管には沢山あります。しかし、乳糖を消化するラクターゼ( $\beta$ -1,4 ガラクトシダーゼとも言います)は、食物中にグルコースやガラクトースのような単糖やデンプンがなく、エネルギー源として乳糖を利用しなくてはいけない時にだけ、小腸で必要最少量作られます。

母乳中に糖質としてのエネルギー源は乳糖しかありません。そのために、母乳しか飲まない乳児の小腸において、必要最少量のラクターゼが作られ、乳糖をグルコースとガラクトースに消化します。それにより、乳糖はエネルギー源としての栄養機能を果たします。

一方、小腸で消化されなかった乳糖は、腸管から吸収できないために、腸に溜まります。カルシウムは、乳糖と結合しているために、無期リン酸と結合できません。そのために、カルシウムは無機塩として沈殿することを免れます。結果的に、小腸でのカルシウムの吸収は、乳糖により促されることとなります。

また、大腸に移行した乳糖は、乳酸菌や大腸菌により乳酸や炭酸ガスに代謝されます。乳酸や炭酸ガスは腸管を刺激して腸の蠕動運動を促します。その結果、乳児の便通は良くなり、便秘になるのを免れます。さらに、乳酸は、腸管でタンパク質の消化により生じるアンモニアやアミンなどの有害物質の中和や、病原性細菌の増殖の抑制により健康維持に寄与します。すなわち、このように、乳糖は腸で様々な生体調節機能を発揮します。

他方、乳糖の甘さは、グルコースの約 1/5、砂糖の約 1/6 しかありません。そのために、母乳は多量の乳糖を含むにも拘らず、砂糖水のような甘さを感じられません。このように、母乳中の糖質が乳糖であることは、発育するのに必要な栄養素を摂取するために、量的にも多く飲まなくてはならない母乳を乳児が飽きることなく飲めるようにしているのです。

すなわち、母乳中の糖質が乳糖であることは、デンプンと同様にエネルギー源としての食品の栄養機能はもとより、デンプンにはない食品の感覚機能や生体調節機能により乳児の健全な発育に寄与しているのです。

なお、牛乳を飲むと下痢をするヒトがいます。こ

れは腸のラクターゼ活性が低いことや、ラクターゼが欠損していることによります。乳糖による下痢は後述する牛乳アレルギーではありません。乳糖不耐症や低ラクターゼ症と呼ばれる疾病です。牛乳を飲むと下痢をするヒトは、日常エネルギー源を乳糖以外の食物で十分に摂取しているために、ラクターゼが腸で作られないことによるのです。

牛乳中の乳糖が殆ど消化されないために、腸に大量の乳糖が蓄積し、大腸菌や乳酸菌により多量の炭酸ガスや乳酸が作られて、腹痛や下痢を起こします。牛乳を飲むと下痢になる人は、ラクターゼにより予め乳糖を分解した加工乳や、乳酸菌が乳糖を分解したヨーグルトの摂取が推奨されます。

#### (4) タンパク質の食品機能

##### 1) 母乳中のタンパク質の存在形態

母乳タンパク質は、母乳中での存在形態により 3 種類に大別されます。脂肪球皮膜に存在する脂肪球皮膜タンパク質、チーズの主成分であるカゼイン、チーズを製造したときの副産物であるホエイ（乳清と同意語です）に含まれるホエイタンパク質です。言い方を換えますと、脂肪を取り巻く脂肪球皮膜タンパク質、脂肪を取り除いた脱脂乳の pH を 4.6 にした時に沈殿するカゼイン、カゼインを除去した後のホエイに溶解しているホエイタンパク質です。

カゼインは 1 種のタンパク質ではなく、複数のタンパク質から出来ています。カゼインが何種類のタンパク質から出来ているかは動物種により異なります。牛乳カゼインは、 $\alpha_{s1}$ -カゼイン、 $\alpha_{s2}$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼインおよび  $\kappa$ -カゼインと呼ばれる 4 種類のカゼインから出来ています。

4 種類のカゼインは、ポリペプチド鎖として乳腺で作られた後に、リン酸や糖が結合した複合タンパク質です。中でも  $\alpha_{s1}$ -カゼイン、 $\alpha_{s2}$ -カゼインおよび  $\beta$ -カゼインには、3 個のセリンがリン酸化されたホスホセリンが連なったホスホセリン集中域と呼ばれる領域があります。しかし、 $\kappa$ -カゼインには、ホスホセリンが 1 個しかないために、ホスホセリン集中域は存在しません。その代わりに、 $\kappa$ -カゼインには、他のカゼインには含まれない糖鎖があります。すなわち、牛乳の 4 種類のカゼインは、すべてリンタンパク質であり、 $\kappa$ -カゼインは糖タンパク質でもあるのです。

ホスホセリン集中域を持つカゼインは、母乳のようにカルシウムを多く含む溶液では、沈殿する性質があります。しかし、ホスホセリン集中域を持たない $\kappa$ -カゼインは、カルシウムの多い溶液中でも沈殿しません。

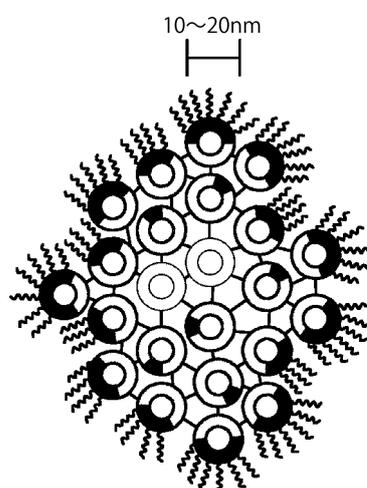
そのために、 $\alpha_{s1}$ -カゼイン、 $\alpha_{s2}$ -カゼインおよび $\beta$ -カゼインのようにカルシウム存在下で沈殿するカゼインをカルシウム感受性カゼインと呼び、 $\kappa$ -カゼインのようにカルシウム存在下でも沈殿しないカゼインをカルシウム非感受性カゼインと呼んでいます。なお、カルシウム感受性カゼインは、ホスホセリン集中域の数が多く、より低濃度のカルシウム溶液で沈殿します。

## 2) カゼインミセルの乳児における栄養生理学的役割

牛乳には30mMのカルシウムが存在します。30mMのカルシウム溶液に各カゼインを単独で溶解させようとしても、 $\kappa$ -カゼイン以外のカゼインは溶解しません。ところが、牛乳1kgには約26gのカゼインが含まれますが、牛乳にカゼインの沈殿を見ることはありません。

その理由は、図1-4に示したように、牛乳中でカゼインは、カルシウム感受性カゼインを内部にして、外部をカルシウム非感受性カゼインの $\kappa$ -カゼインが覆う、カゼインミセルと呼ばれる会合体を作っているからです。

カゼインミセルを牛乳に分散させているのは、 $\kappa$ -カゼインの糖鎖を持つ領域（この領域を“ $\kappa$ -カゼイノグリコペプチド域”と言います）によります。牛



Schmidt (1980) と Walstra が提案したカゼインミセルのモデル (1990) に基づいて作図しました。ドーナツ状の丸はカゼインのサブミセルを示しています。波線および直線は、それぞれ $\kappa$ -カゼインのC-末端側の親水性域（ $\kappa$ -カゼイノグリコペプチド域）およびコロイド性リン酸カルシウムクラスターの架橋を示しています。

図1-4 カゼインミセルの模式図

乳だけではなく、他の哺乳動物の母乳も、カゼインはカゼインミセルとして存在しています。

母乳中でカゼインがミセルとして存在するのは、乳児の栄養生理学的に重要な役割を担っているからです。

乳児が母乳を飲み、母乳成分が胃に到達すると、カゼインミセルはペプシン（ヒトの胃にもウシの胃にも含まれるタンパク質消化酵素です）やキモシン（ウシやヤギなどの反芻動物の胃にしか含まれないタンパク質消化酵素です。古くは、レンニンと言われていました）の作用を受けて、 $\kappa$ -カゼイノグリコペプチドがカゼインミセルから遊離します。すると、カゼインミセルは母乳中で分散することが出来なくなり、凝集します。

カゼインミセルは凝集する時に、脂肪を始めとした多くの母乳成分を巻き込みます。そのために、母乳全体が凝固（この凝固を“凝乳”と呼んでいます）します。凝乳した母乳成分は液体の場合よりも消化管の移動速度が遅くなります。その結果、母乳成分は消化酵素と接する機会が多くなり、母乳成分の消化吸収性が良くなります。

一方、胃から腸に移行したカルシウム感受性カゼインは、依然としてカルシウムを結合しています。腸でタンパク質消化酵素の作用を受けることにより、カルシウム感受性カゼインは、腸で溶解するカゼインホスホペプチドと呼ばれるカルシウムを結合したペプチドを遊離します。カゼインホスホペプチドに結合したカルシウムは、無機リン酸と結合して沈殿するのを免れます。そのために、乳児の発育期に多量必要なカルシウムの腸管での吸収は促されます。このようにカゼインホスホペプチドによるカルシウムの吸収促進作用は、母乳カゼインの重要な生体調節機能なのです。

なお、ヒトは牛乳に仔牛の胃の抽出物（キモシンやペプシンが含まれています。“レンネット”と言っ

ています)を作用させると、凝乳が起こることを古くから知っていました。このことに着目して、保存性の良い、美味しいチーズの製造技術を確立しました。また、カゼインミセルは牛乳のpHが5以下になると凝乳(ゲル化)することに着目し、牛乳に乳酸菌を加えて乳糖を乳酸に変えることによりpHを低下させ、保存性が良く美味しいヨーグルトを製造するようになりました。

### 3) カゼインの栄養学的特性

タンパク質の本来の食品機能は、アミノ酸の供給源としての栄養機能です。タンパク質が、アミノ酸の供給源となるためには、消化管でタンパク質消化酵素の作用を受けてアミノ酸、ジペプチド(アミノ酸が2個結合したもの)、トリペプチド(アミノ酸が3個結合したもの)にならなくてはなりません。

タンパク質は、一般に煮たり焼いたりすると変性(立体構造が壊れること)を起こし、消化され易くなります。カゼインは、最初から変性したタンパク質と言われています。そのためにカゼインの消化性は非常に優れており、アミノ酸の供給源として相応しいのです。

私たちの体内で作ることができないために、食物として摂取しなくてはならないアミノ酸を必須アミノ酸と言っています。カゼインは、必須アミノ酸のバランスが非常に良く出来ています。そのために、カゼインは良質のタンパク質源と言われているのです。

## 2. 母乳タンパク質の一般的性質

母乳タンパク質の生体防御機能を紹介する前に、本項では母乳タンパク質の一般的性質を、次章では生体防御機能の一般的性質を紹介します。

### (1) タンパク質の構造

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合(アミド結合)と呼ばれる脱水縮合反応により結合したものです。加水分解した時に、アミノ酸しか生じないタンパク質を単純タンパク質と言い、アミノ酸とともに糖質、脂質、核酸、金属などを生じるタンパク質を複合タンパク質と呼んでいます。複合タンパク質に含まれる糖質や金属などのアミノ酸以外の分子は

補欠分子族と呼ばれ、一般に生体調節機能の発現において重要な役割を担っています。

タンパク質の構造には、一次構造、二次構造、三次構造および四次構造があります。私たちの体内のタンパク質は、20種類のアミノ酸の組み合わせにより作られています。

アミノ酸のペプチド結合による配列順序を一次構造と呼んでいます。2個のペプチド結合のアミド基とカルボニル基間の水素結合により形成される構造を二次構造と呼んでいます。二次構造には $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、ランダムコイルがあります。

一方、20個のアミノ酸には側鎖と呼ばれる各アミノ酸固有の領域があります。タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖間のジスルフィド結合、イオン結合、疎水結合、水素結合などにより形成される構造を三次構造と呼んでいます。一般に三次構造まで形成することにより、タンパク質固有の生物学的機能が発現します。しかし、抗体のように三次構造まで形成したタンパク質(ポリペプチド鎖)が複数個結合して生物機能を発現するものもあります。このように、複数のポリペプチド鎖が結合して形成される構造を四次構造と呼んでいます。

### (2) タンパク質の消化吸収

食物の消化やエネルギーの生産には、酵素の作用が不可欠です。酵素はすべてタンパク質です。生きていくのに不可欠な酸素を運搬するヘモグロビン、爪、髪の毛、抗体もすべてタンパク質です。ホルモンにもインスリンのようにタンパク質のものがあります。このように、タンパク質には多種多様な生物機能があり、それらの機能により私たちの生命は維持されています。

一方、食品としてのタンパク質の役割は、体の構成成分であるタンパク質を作るためのアミノ酸の供給源やエネルギー源となることです。牛肉を食べても、ウシの筋肉がそのままの状態で私たちの筋肉になることは出来ません。食品として摂取したタンパク質は、消化管で消化され、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチドになって腸管から能動的に吸収されます。

タンパク質を消化する酵素は、ペプチドの内部を切断するエンドペプチダーゼ(プロティナーゼとも言います)とアミノ末端やカルボキシ末端からア

ミノ酸を遊離するエキソペプチダーゼ（単にペプチダーゼとも言います）に分類されます。胃にはペプシンと呼ばれるエンドペプチダーゼがあり、腸にはトリプシンやキモトリプシンと呼ばれるエンドペプチダーゼがあります。また、腸にはアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼがあります。

### (3) カゼイン

ホルスタイン種牛の常乳（私たちが日常飲んでいる分娩後約8日目から約10カ月間の母乳のことです。分娩後、約1週間の母乳を“初乳”と言います）1kgには、30～35gのタンパク質が含まれます。その約1%が脂肪球皮膜タンパク質、約80%がカゼイン、残りがホエイタンパク質です。また、それらのタンパク質は、いずれも1種類のタンパク質から出来ているのではなく、複数のタンパク質から出来ています。

ホルスタイン種牛の母乳を例にすると、カゼインは $\alpha_{s1}$ -カゼイン、 $\alpha_{s2}$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼインおよび $\kappa$ -カゼインからなり、それらの割合は約40:10:35:15です。牛乳中でそれらのカゼインは、単独で溶解しているのではなく、カゼインミセルとして分散しています。

#### 1) カゼインミセルの物理化学的性質

カゼインミセルの大きさは均一ではありません。カゼインミセルの直径は、約20～600nmであり、そのうち100～200nmのものが最も多く存在します。カゼインミセルを超遠心分離機を用いて脱脂乳から取り出すことができます。

表1-2に示したように、カゼインミセルには、カゼインだけではなく、カルシウムやリンを始めとしたミネラルやクエン酸が含まれます。直径の大きなカゼインミセルほどカゼインに対するミネラルの割合が多く、逆にカルシウム感受性カゼインに対するカルシウム非感受性カゼインの割合が少なくなっています。カゼインミセルの構造は古くから関心がもたれ、多くの研究者により、研究されてきました。しかし、科学が発達している今日でも、表1-2に示した母乳成分が、カゼインミセルの中でどのように配置しているのかを直接見ることは出来ません。しかし、カゼインミセルに関する様々な実験結果に基づき、カゼインミセルの模式図が50年近く前から

表 1-2 牛乳カゼインミセルの組成

成分	含量 (g/100g ミセル)
カゼイン	93.3
$\alpha_{s1}$ -カゼイン	35.6
$\alpha_{s2}$ -カゼイン	9.9
$\beta$ -カゼイン	35.9
$\kappa$ -カゼイン	11.9
ミネラル	6.30
カルシウム	2.87
リン	2.89
マグネシウム	0.11
ナトリウム	0.11
カリウム	0.26
その他	0.06
クエン酸	0.40

提案されてきました。

現在、最も信頼されているカゼインミセルの模式図は、①カゼインミセルを電子顕微鏡で観察すると球状であること、②小さいカゼインミセルほど $\kappa$ -カゼインの占める割合が多いこと、③カゼインミセルを含む溶液にイオン結合を切断する試薬を加えると小さなカゼインミセルになること、④ $\kappa$ -カゼインの疎水性領域と親水性領域の境目にある105番目のフェニルアラニンと106番目のメチオニンのペプチド結合を切断するキモシンを作用させると、ミセルは沈殿することなどの実験結果から提案されています。

現在、最も信頼されているカゼインミセルの模式図を、既に図1-4に示しました。小さなドーナツ状の丸（直径10～20nm）はサブミセルと呼び、このサブミセルの表面を各カゼイン成分の親水性領域が覆っています。

サブミセルにおいてカルシウム感受性カゼインのホスホセリン集中域のリン酸基とコロイド性リン酸カルシウム（ $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6$ ）の間の架橋が多いほどミセルは大きくなります。一方、サブミセルの表面を $\kappa$ -カゼインの親水域（ $\kappa$ -カゼイノグリコペプチド域）が覆うと、コロイド性リン酸カルシウムとの間に架橋ができなくなり、ミセルは大きくなるのが出来ません。すなわち、大きなカゼインミセルほど $\kappa$ -カゼインの占める割合が少ないことを説明しています。また、イオン結合を切断するとコロイド性リン酸カルシウムとホスホセリン間のイオン結合が切断され、小さなカゼインミセルになることも説明

できます。

## 2) 各カゼインの性質

各カゼインには、①リン酸化されたセリンやスレオニンがあること、②相対的にプロリン数が多いこと、③親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸が局在していること、などの一次構造上共通した性質があります。

カゼインのリン酸化は、一次構造上、セリン（またはスレオニン）-X（Xは20種類のアミノ酸、ホスホセリン、ホスホスレオニンの何でも良いことを意味しています）-グルタミン酸（またはアスパラギン酸、ホスホセリン、ホスホスレオニンのいずれか）という配列の、セリンまたはスレオニンに、カゼインキナーゼと呼ばれるリン酸化酵素が作用することにより起こります。

タンパク質のアミノ酸配列は遺伝子レベルで決定されます。しかし、いずれのカゼインも、塩基配列のごく限られた部分の置換や削除により、特定のアミノ酸配列が異なる複数の成分から出来ています。このように、特定のアミノ酸配列が異なるカゼインを遺伝的変異体と呼んでいます。カゼインが乳腺細胞で合成された後に、母乳中のタンパク質消化酵素

の作用を受け、一部の構造を失ったものもあります。例えば、1984年までは $\gamma$ -カゼインと言われていたカゼインは、血液から母乳に移行したプラスミンと名付けられたタンパク質消化酵素により、 $\beta$ -カゼインのN-末端側のペプチドの一部を失ったものです。そのために、今の牛乳タンパク質の命名法には、 $\gamma$ -カゼインと言うカゼインはなく、 $\beta$ -カゼインのフラグメントとして記述します。

カゼインは、非常に消化性の良いタンパク質であり、以前は、カゼインの機能はアミノ酸の供給源とだけ考えられていました。ところが、1970年代後半から、カゼインの消化物から様々な生体調節ペプチドが分離され、現在では、カゼインには新生児の発育に重要な生理的役割が備わっていると考えられています。

以下に各カゼインの一般的性質とカゼインの消化により生じるペプチドの古くから知られている生体調節機能を紹介します。

### a. $\alpha_{s1}$ -カゼイン

$\alpha_{s1}$ -カゼインは、199個（176個からなる変異体もあります）のアミノ酸からなる分子量約23,600のタンパク質です。図1-5に $\alpha_{s1}$ -カゼイン遺伝的変

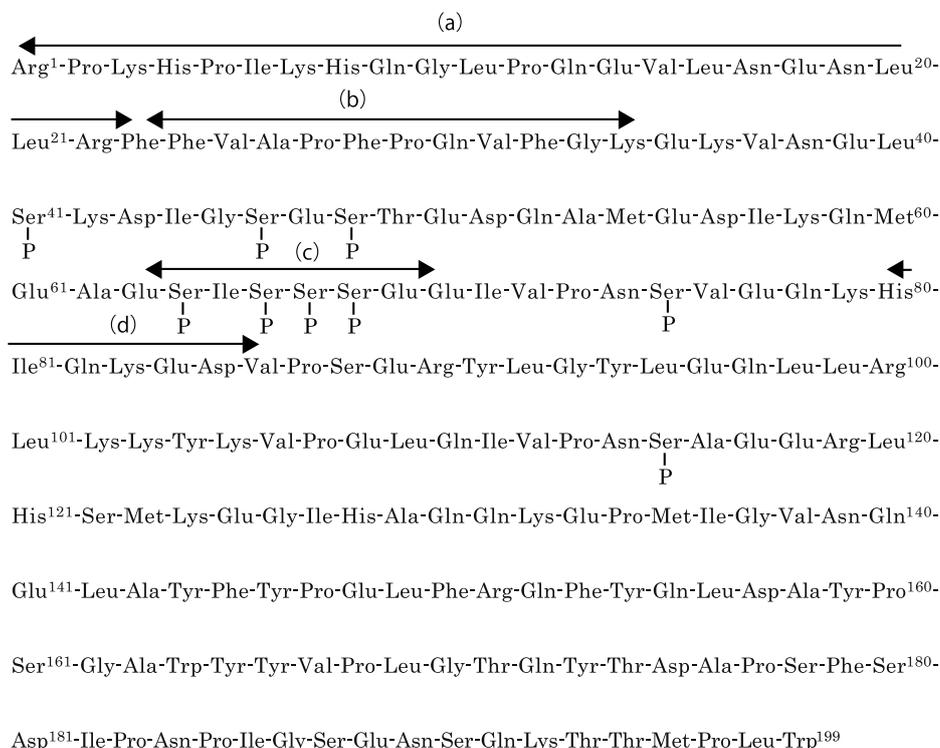


図1-5 牛乳 $\alpha_{s1}$ -カゼインBの一次構造と潜在的な生体調節活性領域

p: リン酸 (a) T細胞の増殖促進領域、食細胞活性化領域 (b) アンジオテンシンI変換酵素阻害領域 (c) カルシウム吸収促進領域、T細胞とB細胞に対するマイトージェン活性領域、IgA産生促進領域、IL-6産生促進領域 (d) オピオイド活性領域

異体 B ( $\alpha_{s1}$ -カゼイン B と表します) の一次構造を示しました。

$\alpha_{s1}$ -カゼインには、アスパラギン酸、グルタミン酸およびホスホセリンなどの酸性アミノ酸が 40-80 域に集中しており、その両端は疎水性アミノ酸に富んでいます。 $\alpha_{s1}$ -カゼイン B は 9 個のホスホセリンを含んでおり、ホスホセリン集中域が 1 か所と、ホスホセリンを両端に持ち中心がグルタミン酸の領域が 1 個あります。

温度により異なりますが、 $\alpha_{s1}$ -カゼイン B は 3 ~ 8mM 以上のカルシウムを含む溶液では沈殿します。また、 $\alpha_{s1}$ -カゼインには  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートなどの規則的な二次構造の形成を妨げるプロリンが 17 個含まれます。一般に安定した三次構造の形成には、システインのチオール基による分子内ジスルフィド結合が重要ですが、 $\alpha_{s1}$ -カゼインにはシステインは全く含まれていません。そのために、 $\alpha_{s1}$ -カゼインは、 $\beta$ -カゼインとともに、安定した一定の三次構造を作ることが出来ません。このことが、カゼインは最初から変性したタンパク質と言われる所以であり、 $\alpha_{s1}$ -カゼインの消化性が優れていること

の説明になるのです。

$\alpha_{s1}$ -カゼインの消化物から分離された生体調節ペプチドの一次構造上の領域を図 1-5 に示しました。 $\alpha_{s1}$ -カゼインの消化により、血圧を下げるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドやカルシウムの吸収を促進するカゼインホスホペプチドなど多様なペプチドが遊離します。このことは、カゼインは単にアミノ酸の供給源としての栄養機能だけではなく、生体調節機能も担っていることを示しています。

なお、 $\alpha_{s1}$ -カゼインと、次に説明する  $\alpha_{s2}$ -カゼインをヒトは体内で作ることが出来ないために、これらのカゼインは人乳にはありません。そのために、これらのカゼインは牛乳アレルギーの主因物質と考えられています。

#### b. $\alpha_{s2}$ -カゼイン

$\alpha_{s2}$ -カゼインは、207 個のアミノ酸からなる分子量約 25,200 のタンパク質です。図 1-6 に  $\alpha_{s2}$ -カゼイン A の一次構造を示しました。 $\alpha_{s2}$ -カゼインはホスホセリンを 10 ~ 13 個含みます。図に示した  $\alpha_{s2}$ -カゼイン A は、12 個のホスホセリンをもち、ホスホセリン集中域を 3 個持ちます。

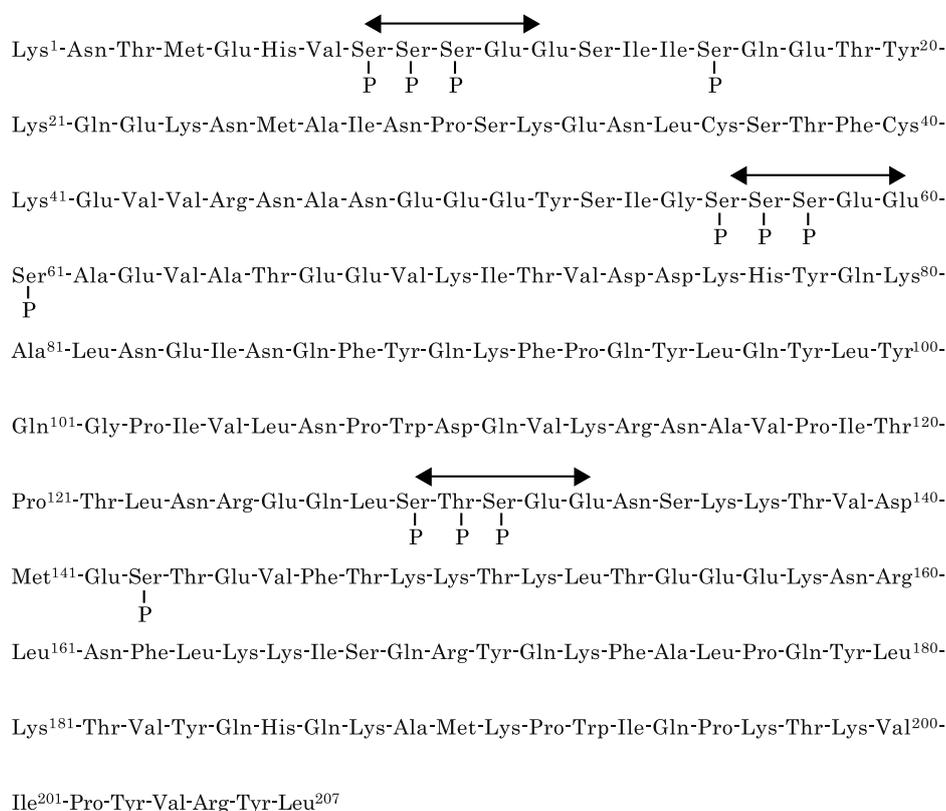


図 1-6 牛乳  $\alpha_{s2}$ -カゼイン A の一次構造と生体調節活性領域

矢印の領域は、すべてホスホセリン集中域であり、カルシウム吸収促進領域、T 細胞と B 細胞に対するマイトージェン活性領域、IgA 産生促進領域および IL-6 産生促進領域を示しています。

$\alpha_{s2}$ -カゼインはカルシウム感受性が最も高いカゼインであり、2mM以上のカルシウム溶液中で沈殿します。 $\alpha_{s2}$ -カゼインは、一次構造上8-12域、56-63域および129-133域が親水域で、それら以外の領域は疎水域です。

$\alpha_{s2}$ -カゼインの消化物から分離された生体調節ペプチドの一次構造上の領域を、図1-6に示しました。 $\alpha_{s2}$ -カゼイン1分子の消化によりカルシウムの吸収を促進するカゼインホスホペプチドが3個遊離します。

**c.  $\beta$ -カゼイン**

$\beta$ -カゼインは、209個のアミノ酸からなる分子量約24,000のシステインを全く含まないタンパク質です。図1-7に $\beta$ -カゼインA1の一次構造を示しました。カルシウム感受性カゼインは、すべてホスホセリン集中域を持っていますが、 $\beta$ -カゼインのホスホセリン集中域は $\alpha_{s1}$ -カゼインや $\alpha_{s2}$ -カゼインと異なり1か所しかありません。そのために $\beta$ -カ

ゼインは、カルシウム感受性カゼインのうちで最もカルシウムに対する感受性が低いカゼインです。

温度により異なりますが、 $\beta$ -カゼインは、8～15mM以上のカルシウム溶液中でないと沈殿しません。 $\beta$ -カゼインは、N-末端から50番目までの領域にホスホセリン集中域をはじめとした親水性アミノ酸を多く含み、50番目以降は疎水性アミノ酸に富んでいます。そのために、 $\beta$ -カゼインは典型的な両親媒性構造をしています。

$\beta$ -カゼインは、50残基目以降に35個のプロリンを含むために、規則的な二次構造を形成出来ず、 $\alpha$ -ヘリックスは1～20%、 $\beta$ -シートは0～33%と算出されています。

人乳カゼインの大半を占めるのは $\beta$ -カゼインです。しかし、牛乳と人乳の $\beta$ -カゼインの免疫化学的相同性は1/4程度しかありません。そのために、牛乳 $\beta$ -カゼインも牛乳アレルギーの原因物質です。

牛乳 $\beta$ -カゼインの消化物からも種々の生体調節

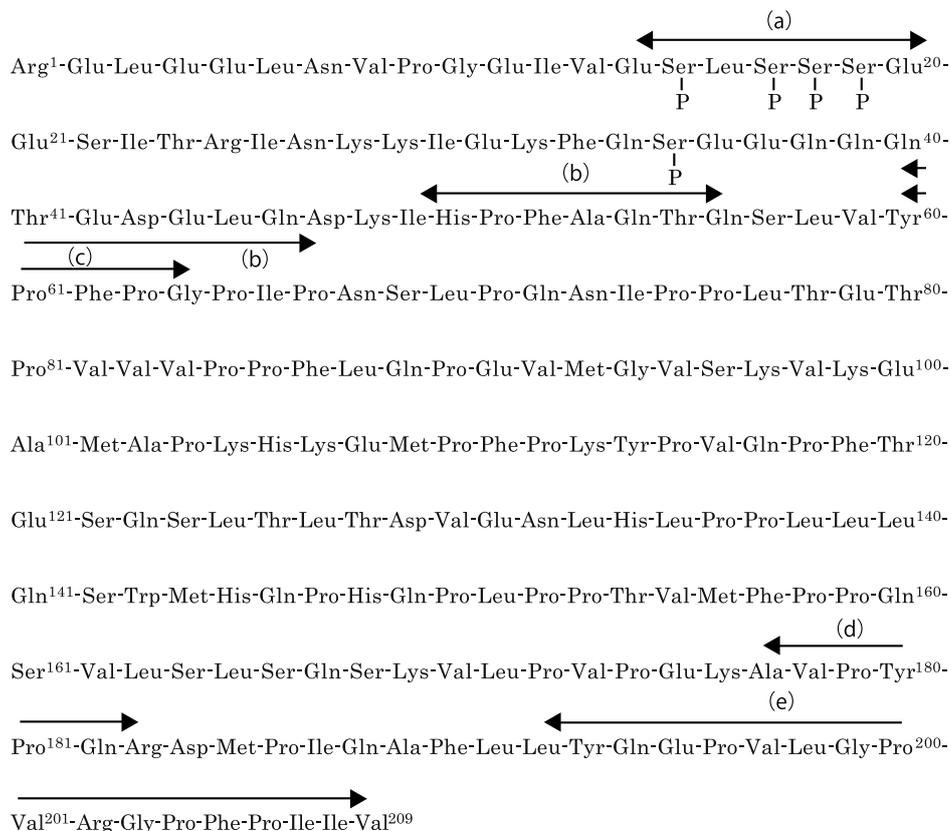


図1-7 牛乳 $\beta$ -カゼインA1の一次構造と生体調節活性領域

- (a) カルシウム吸収促進領域, T細胞とB細胞に対するマイトージェン活性領域, IgA産生促進領域, IL-6産生促進領域
- (b) プロリルエンドペプチダーゼ阻害領域
- (c) オピオイド活性領域
- (d) アンジオテンシンI変換酵素阻害領域, DNA合成促進領域, グルカゴン増強領域
- (e) リンパ球の増殖促進領域

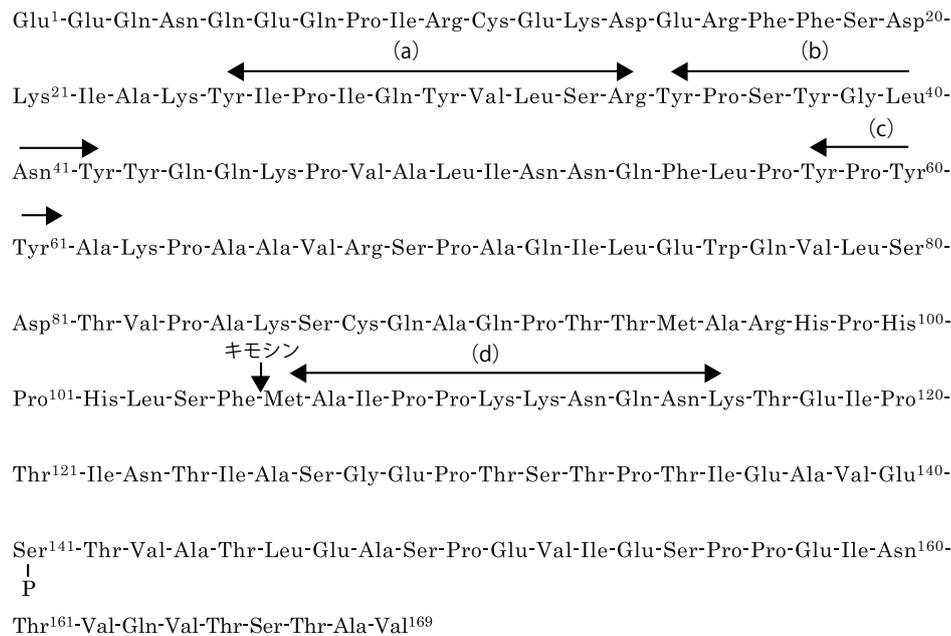


図 1-8 牛乳 κ- カゼイン B の一次構造と生体調節活性領域

1-105 域 (パラ-κ- カゼイン) : IgM 産生促進領域

106-169 (κ- カゼイノグリコペプチド) : インフルエンザウイルスによる赤血球凝集阻害領域, コレラトキシンのレセプターへの結合阻害領域, インターフェロン-βの産生阻害領域, B細胞とT細胞の増殖阻害領域, インターロイキン-1レセプターアンタゴニストの生産促進領域, ヘルパーT細胞上へのインターロイキン-2レセプターの発現阻害領域, 胃液分泌阻害領域

- (a) アンジオテンシンI変換酵素阻害領域, オピオイドアンタゴニスト活性領域, 平滑筋作動領域
- (b) オピオイドアンタゴニスト活性領域
- (c) オピオイドアンタゴニスト活性領域
- (d) 血小板凝集抑制領域

ペプチドが分離されています。それら生体調節ペプチドの一次構造上の領域を図 1-7 に示しました。

#### d. κ- カゼイン

κ- カゼインは、169 個のアミノ酸からなる分子量約 19,000 のシステインを 2 個含むタンパク質です。κ- カゼインもホスホセリンを 1 個含むために、他のカゼインと同様に、リンタンパク質ですが、ホスホセリン集中域がないために、カルシウム非感受性カゼインです。

κ- カゼインは、N- アセチルグルコサミン, ガラクトースおよびシアル酸からなる糖鎖を含んでおり、カゼインの中では唯一の糖タンパク質です。図 1-8 に、κ- カゼイン B の一次構造を示しました。κ- カゼインの N- 末端から 105 番目までは疎水性アミノ酸に富んだ疎水域ですが、それ以降は糖鎖, ホスホセリン, 多くの親水性アミノ酸を含んだ親水域です。そのために、κ- カゼインは 105 番目と 106 番目を境界にして、典型的な両親媒性構造をしています。κ- カゼインはプロリンを 20 個含み、α- ヘリックスおよび β- シートは、それぞれ 14% および 31%

と算出されています。

κ- カゼインの 105 番目までの疎水域は“パラ-κ- カゼイン”と言われ、それ以降の親水域は“κ- カゼイノグリコペプチド”と言われます。キモシンやペプシンは、κ- カゼインの 105 番目のフェニルアラニンと 106 番目のメチオニンのペプチド結合を切断し、κ- カゼイノグリコペプチドをカゼインミセルから遊離させます。そのために、カルシウム感受性カゼインが沈殿し、凝乳が起こります。κ- カゼインは、β- カゼインとともに、人乳にも含まれますが、牛乳 κ- カゼインと人乳 κ- カゼインには免疫化学的相同性は全くありません。そのために、κ- カゼインも牛乳アレルギーの原因物質です。

牛乳 κ- カゼインの糖鎖の占める割合は約 3% ですが、人乳 κ- カゼインの糖鎖の占める割合は約 39% です。一般に、シアル酸には様々な生体調節機能があることが知られていますが、シアル酸を含む糖鎖を持つ κ- カゼイノグリコペプチドにも、様々な生体調節機能があることが明らかにされています。

表 1-3 牛乳および人乳の主要ホエイタンパク質の種類と含量

種類	牛乳	人乳
	含量 (g/kg)	
全ホエイタンパク質	4～7	3～8
α-ラクトアルブミン	0.6～1.7	1.5
β-ラクトグロブリン	2～4	0
血清アルブミン	0.1～0.4	0.3～0.5
ラクトフェリン	0.02～0.2 (初乳; 1)	2～4 (初乳; 6～8)
免疫グロブリン		
IgG	0.72 (初乳; 32～212)	0.03～0.04 (初乳; 0.43)
IgG1	0.6 (初乳; 20～200)	
IgG2	0.12 (初乳; 12)	
sIgA	0.13 (初乳; 3.5)	1 (初乳; 17.35)
IgM	0.03～0.04 (初乳; 8.7)	0.1～0.02 (初乳; 1.59)
分泌片 (SC)	0.2 (初乳; 0.5)	0.02 (初乳; 2.09)

牛乳 κ-カゼインの消化物から分離された生体調節ペプチドの一次構造上での領域を、図 1-8 に示しました。

#### (4) ホエイタンパク質

ホエイタンパク質は、牛乳では全タンパク質の約 19% を、人乳では 60～70% を占めています。ホエイタンパク質は、α-ラクトアルブミン、β-ラクトグロブリン、血清アルブミン、ラクトフェリン、免疫グロブリン、プロテオース・ペプトン、酵素、微量感染防御タンパク質などに分かれます。

表 1-3 に牛乳と人乳の主要ホエイタンパク質の含有量を示しました。牛乳と人乳では構成しているホエイタンパク質の種類や量が異なります。カゼインと比べれば、いずれのホエイタンパク質も母乳中での濃度は低いが、新生児の感染防御を始めとした顕在的生体調節機能に富んでいます。牛乳中の主要ホエイタンパク質を例にして、母乳の主要ホエイタンパク質の一般的性質を以下に紹介します。

##### 1) β-ラクトグロブリン

β-ラクトグロブリンは乳腺細胞で作られるタンパク質であり、牛乳では、全ホエイタンパク質の約 50% を占めています。しかし、ヒトは、β-ラクトグロブリンを作ることはできないために、人乳は β-ラクトグロブリンを含んでいません。

牛乳 β-ラクトグロブリンの一次構造と高次構造の模式図を、図 1-9 に示しました。牛乳 β-ラクトグロブリンは 162 個のアミノ酸からなる分子量約

18,000 のタンパク質です。β-ラクトグロブリンは 5 個のシステインを持ち、そのうちの 4 個は分子内ジスルフィド結合の形成に参与しています。ジスルフィド結合の形成に参与しない 1 個のシステインのチオール基は、遊離の状態で存在しています。牛乳 β-ラクトグロブリンの α-ヘリックス含量は約 10%、β-構造は約 50% と算出されています。

牛乳中で β-ラクトグロブリンは 2 分子が会合した 2 量体として存在しています。しかし、溶解している pH により、β-ラクトグロブリンは異なった会合体を形成します。pH5.5～7.0 では 2 量体、pH3.5～5.2 では 8 量体、pH3.0 以下や pH7.0 以上では単量体です。

β-ラクトグロブリンの遊離のシステインのチオール基は、分子間ジスルフィド結合を形成しやすく、加熱により β-ラクトグロブリン同志の凝集物や κ-カゼインとの間の複合体を形成します。高圧処理による β-ラクトグロブリンのゲル化も遊離のシステインのチオール基の反応によるものです。

β-ラクトグロブリンは反芻動物や、単胃の動物でもブタやウサギの乳には含まれますが、人乳やマウスの乳には含まれません。そのために、β-ラクトグロブリンの生理的役割は古くから注目されてきました。

近年、β-ラクトグロブリンは、レチノール結合タンパク質と一次構造が似ていることや、レチノールやビタミン A などの疎水性化合物と結合できることが明らかにされました。そのために、β-ラクトグロブリンの新生児における生理的役割は、ビタ

<sup>1</sup> Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr-<sup>20</sup>  
<sup>21</sup> Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-<sup>40</sup>  
<sup>41</sup> Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-<sup>60</sup>  
<sup>61</sup> Trp-Glu-Asn-Asp-Glu-Cys-Ala-Gln-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-<sup>80</sup>  
<sup>81</sup> Val-Phe-Lys-Ile-Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-<sup>100</sup>  
<sup>101</sup> Lys-Tyr-Leu-Leu-Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-Pro-Glu-Gln-Ser-Leu-Val-Cys-Gln-<sup>120</sup>  
<sup>121</sup> Cys-Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-<sup>140</sup>  
<sup>141</sup> Lys-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-Glu-Glu-Gln-Cys-<sup>160</sup>  
<sup>162</sup> His-Leu

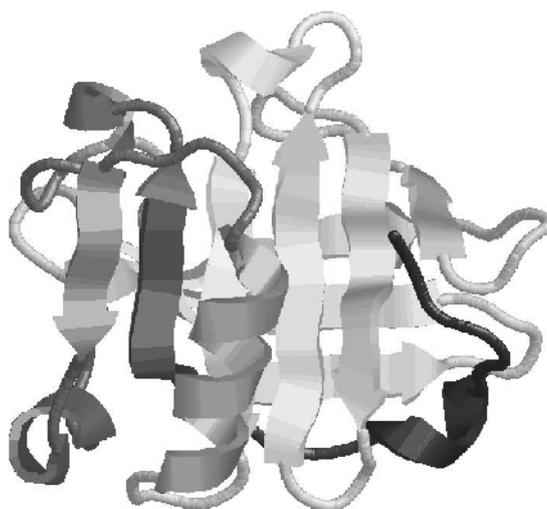


図 1-9 牛乳β-ラクトグロブリン A の一次構造と高次構造の模式図

Cys66 と Cys160 および Cys106 と Cys119 の間にジスルフィド結合が形成されています。Cys121 は遊離のシステインです。高次構造において幅の太い巻いたリボン状の領域は α-ヘリックスを、矢印の付いた領域は β-シートを表しています。

高次構造の出典：<http://staff.aist.go.jp/munehito-arai/arai/BLG.jpg>

ミン A やレチノールなどの疎水性物質の輸送や吸収を担っていると考えられています。

β-ラクトグロブリンは、人乳に含まれないことやヒトの胃の消化酵素であるペプシンで消化されにくいことから、牛乳アレルギーの主因物質になっています。

## 2) α-ラクトアルブミン

α-ラクトアルブミンも β-ラクトグロブリンと同様に、乳腺細胞で作られるタンパク質です。α-ラクトアルブミンは乳糖の合成のために不可欠であることから、牛乳や人乳などほとんどの母乳に含まれる主要ホエイタンパク質です。

人乳および牛乳 α-ラクトアルブミンの一次構造と高次構造の模式図を、図 1-10 に示しました。人乳および牛乳 α-ラクトアルブミンは、ともに 123

個のアミノ酸からなる分子量約 14,400 のペプチド鎖にカルシウム 1 原子が結合した金属タンパク質です。α-ラクトアルブミンは、8 個のシステインを持ち、それらはすべて分子内ジスルフィド結合の形成に関与しています。

α-ラクトアルブミンの α-ヘリックス含量は約 26%、β-シート含量は約 14% と算出されています。また、α-ラクトアルブミンには、糖鎖を持つものや、ジスルフィド結合を 3 個しか持たないものも微量存在することが知られています。

牛乳 α-ラクトアルブミンと鶏卵リゾチームのアミノ酸の類似性は高く、123 個のアミノ酸中 47 個が一次構造上同じ位置にあり、ジスルフィド結合の位置も極めて類似しています。そのために、α-ラクトアルブミンと卵白リゾチームは同じ祖先のタンパク質から分化したタンパク質と考えられています。

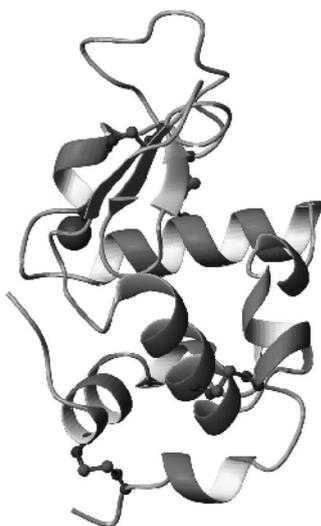
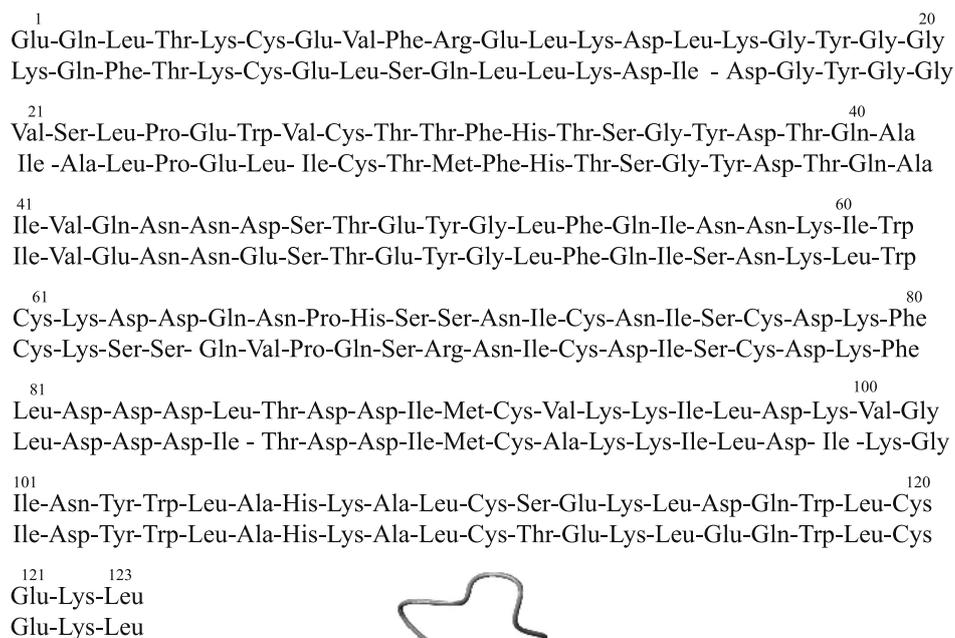


図 1-10 牛乳  $\alpha$ -ラクトアルブミン（上段）および人乳  $\alpha$ -ラクトアルブミン（下段）の一次構造とそれらの 高次構造の模式図

Cys 6 と Cys120, Cys28 と Cys111, Cys61 と Cys77 および Cys73 と Cys91 の間にジスルフィド結合が形成されています。高次構造において巻いたりボン状の領域は  $\alpha$ -ヘリックスを、幅の太い矢印のついた領域は  $\beta$ -シートを表しています。

高次構造の出典：<http://staff.aist.go.jp/munehito-arai/arai/BLG.jpg>

す。しかし、卵白リゾチームは、 $\alpha$ -ラクトアルブミンのように、カルシウムと結合することは出来ません。

人乳および牛乳  $\alpha$ -ラクトアルブミンは、胸腺細胞や腫瘍細胞にプログラミングされた細胞死であるアポトーシスを誘導することや、その誘導にはカルシウム結合能が関係していることが明らかにされています。

### 3) 血清アルブミン

母乳の血清アルブミンは、母動物の肝臓で合成された血清アルブミンが母乳に移行したものです。牛乳では全タンパク質の約 1.3% を占め、人乳では約

5% を占めています。ウシおよびヒト血清アルブミンは、それぞれ 582 個および 585 個のアミノ酸から出来ており、分子量は約 66,000 です。ウシ血清アルブミンとヒト血清アルブミンはともに 17 個の分子内ジスルフィド結合を持っています。

血清アルブミンの生体調節機能は、血液の浸透圧の維持であることは古くから知られていましたが、脂肪酸、胆汁色素、ビリルビン、サイロキシン、副腎皮質ホルモン、性ホルモンおよび金属イオンなどの運搬機能、酸化還元緩衝機能、テストステロンの合成促進機能などの機能もあることが、近年、明らかにされています。

1 Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-20  
Gly-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-  
21 Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-40  
Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-Asp-  
41 Phe-Ala-Leu-Glu-Cys-Ile-Arg-Ala-Ile-Ala-Glu-Lys-Lys-Ala-Asp-Ala-Val-Thr-Leu-Asp-60  
Ser-Pro-Ile-Gln-Cys-Ile-Gln-Ala-Ile-Ala-Glu-Asn-Arg-Ala-Asp-Ala-Val-Thr-Leu-Asp-  
61 Gly-Gly-Met-Val-Phe-Glu-Ala-Gly-Arg-Asp-Pro-Tyr-Lys-Leu-Arg-Pro-Val-Ala-Ala-Glu-80  
Gly-Gly-Phe-Ile-Tyr-Glu-Ala-Gly-Leu-Ala-Pro-Tyr-Lys-Leu-Arg-Pro-Val-Ala-Ala-Glu-  
81 Ile-Tyr-Gly-Thr-Lys-Glu-Ser-Pro-Gln-Thr-His-Tyr-Tyr-Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys-100  
Val-Tyr-Gly-Thr-Glu-Arg-Gln-Pro-Arg-Thr-His-Tyr-Tyr-Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys-  
101 Gly-Ser-Asn-Phe-Gln-Leu-Asp-Gln-Leu-Gln-Gly-Arg-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Gly-Leu-Gly-120  
Gly-Gly-Ser-Phe-Gln-Leu-Asn-Glu-Leu-Gln-Gly-Leu-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Gly-Leu-Arg-  
121 Arg-Ser-Ala-Gly-Trp-Val-Ile-Pro-Met-Gly-Ile-Leu-Arg-Pro-Tyr-Leu-Ser-Trp-Thr-Glu-140  
Arg-Thr-Ala-Gly-Trp-Asn-Val-Pro-Thr-Gly-Thr-Leu-Arg-Pro-Phe-Leu-Asn-Trp-Thr-Gly-  
141 Ser-Leu-Glu-Pro-Leu-Gln-Gly-Ala-Val-Ala-Lys-Phe-Phe-Ser-Ala-Ser-Cys-Val-Pro-Cys-160  
Pro-Pro-Glu-Pro-Ile-Glu-Ala-Ala-Val-Ala-Arg-Phe-Phe-Ser-Ala-Ser-Cys-Val-Pro-Gly-  
161 Ile-Asp-Arg-Gln-Ala-Tyr-Pro-Asn-Leu-Cys-Gln-Leu-Cys-Lys-Gly-Glu-Gly-Glu-Asn-Gln-180  
Ala-Asp-Lys-Gly-Gln-Phe-Pro-Asn-Leu-Cys-Arg-Leu-Cys-Ala-Gly-Thr-Gly-Glu-Asn-Lys-  
181 Cys-Ala-Cys-Ser-Ser-Arg-Glu-Pro-Tyr-Phe-Gly-Tyr-Ser-Gly-Ala-Phe-Lys-Cys-Leu-Gln-200  
Cys-Ala-Phe-Ser-Ser-Gln-Glu-Pro-Tyr-Phe-Ser-Tyr-Ser-Gly-Ala-Phe-Lys-Cys-Leu-Arg-  
201 Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Val-Lys-Glu-Thr-Thr-Val-Phe-Glu-Asn-Leu-Pro-Glu-220  
Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Ile-Arg-Glu-Ser-Thr-Val-Phe-Glu-Asp-Leu-Ser-Asp-  
221 Lys-Ala-Asp-Arg-Asp-Gln-Tyr-Glu-Leu-Leu-Cys-Leu-Asn-Asn-Ser-Arg-Ala-Pro-Val-Asp-240  
Glu-Ala-Glu-Arg-Asp-Glu-Tyr-Glu-Leu-Leu-Cys-Pro-Asp-Asn-Thr-Arg-Lys-Pro-Val-Glu-  
241 Ala-Phe-Lys-Glu-Cys-His-Leu-Ala-Gln-Val-Pro-Ser-His-Ala-Val-Val-Ala-Arg-Ser-Val-260  
Lys-Phe-Lys-Asp-Cys-His-Leu-Ala-Arg-Val-Pro-Ser-His-Ala-Val-Val-Ala-Arg-Ser-Val-  
261 Asp-Gly-Lys-Glu-Asp-Leu-Ile-Trp-Lys-Leu-Leu-Ser-Lys-Ala-Gln-Glu-Lys-Phe-Gly-Lys-280  
Asn-Gly-Lys-Glu-Asp-Ala-Ile-Trp-Asn-Leu-Leu-Arg-Gln-Ala-Gln-Glu-Lys-Phe-Gly-Lys-

281 300  
 Asn-Lys-Ser-Arg-Ser-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Ser-Pro-Pro-Gly-Gln-Arg-Asp-Leu-Leu-Phe-  
 Asp-Lys-Ser-Pro-Lys-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Ser-Pro-Ser-Gly-Gln-Lys-Asp-Leu-Leu-Phe-

301 320  
 Lys-Asp-Ser-Ala-Leu-Gly-Phe-Leu-Arg-Ile-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Ser-Ala-Leu-Tyr-Leu-  
 Lys-Asp-Ser-Ala-Ile-Gly-Phe-Ser-Arg-Val-Pro-Pro-Arg-Ile-Asp-Ser-Gly-Leu-Tyr-Leu-

321 340  
 Ala-Ser-Arg-Tyr-Leu-Thr-Thr-Leu-Lys-Asn-Leu-Arg-Glu-Thr-Ala-Glu-Glu-Val-Lys-Ala-  
 Gly-Ser-Gly-Tyr-Phe-Thr-Ala-Ile-Gln-Asn-Leu-Arg-Lys-Ser-Glu-Glu-Glu-Val-Ala-Ala-

341 360  
 Arg-Tyr-Thr-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Val-Gly-Pro-Glu-Glu-Gln-Lys-Lys-Cys-Gln-Gln-  
 Arg-Arg-Ala-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Tyr-Gly-Glu-Gln-Glu-Leu-Arg-Lys-Cys-Asn-Gln-

361 380  
 Trp-Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln-Asn-Val-Thr-Cys-Ala-Thr-Ala-Ser-Thr-Thr-Asp-Asp-Cys-  
 Trp-Ser-Gly-Leu-Ser-Glu-Gly-Ser-Val-Thr-Cys-Ser-Ser-Ala-Ser-Thr-Thr-Glu-Asp-Cys-

381 400  
 Ile-Val-Leu-Val-Leu-Lys-Gly-Glu-Ala-Asp-Ala-Leu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gly-Tyr-Ile-Tyr-  
 Ile-Ala-Leu-Val-Leu-Lys-Gly-Glu-Ala-Asp-Ala-Met-Ser-Leu-Asp-Gly-Gly-Tyr-Val-Tyr-

401 420  
 Thr-Ala-Gly-Lys-Cys-Gly-Leu-Val-Pro-Val-Leu-Ala-Glu-Asn-Arg-Lys-Ser-Ser-Lys-Tyr-  
 Thr-Ala-Cys-Lys-Cys-Gly-Leu-Val-Pro-Val-Leu-Ala-Glu-Asn-Tyr-Lys-Ser-Gln-Gln-Ser-

421 440  
 Ser-Ser-Leu-Asp-Cys-Val-Leu-Arg-Pro-Thr-Glu-Gly-Tyr-Leu-Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-  
 Ser-Asp-Pro-Asp-Pro-Asn-Cys-Val-Asp-Arg-Pro-Val-Glu-Gly-Tyr-Leu-Ala-Val-Ala-Val-

441 460  
 Lys-Ala-Asn-Glu-Gly-Leu-Thr-Trp-Asn-Ser-Leu-Lys-Asp-Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Ala-  
 Val-Arg-Arg-Ser-Asp-Thr-Ser-Leu-Thr-Trp-Asn-Ser-Val-Lys-Gly-Lys-Lys-Ser-Cys-His-

461 480  
 Val-Asp-Arg-Thr-Ala-Gly-Trp-Asn-Ile-Pro-Met-Gly-Leu-Ile-Val-Asn-Gln-Thr-Gly-Ser-  
 Thr-Ala-Val-Asp-Arg-Thr-Ala-Gly-Trp-Asn-Ile-Pro-Met-Gly-Leu-Leu-Phe-Asn-Gln-Thr-

481 500  
 Cys-Ala-Phe-Asp-Glu-Phe-Phe-Ser-Gln-Ser-Cys-Ala-Pro-Gly-Arg-Asp-Pro-Lys-Ser-Arg-  
 Gly-Ser-Cys-Lys-Phe-Asp-Glu-Tyr-Phe-Ser-Gln-Ser-Cys-Ala-Pro-Gly-Ser-Asp-Pro-Arg-

501 520  
 Leu-Cys-Ala-Leu-Cys-Ala-Gly-Asp-Asp-Gln-Gly-Leu-Asp-Lys-Cys-Val-Pro-Asn-Ser-Lys-  
 Ser-Asn-Leu-Cys-Ala-Leu-Cys-Ile-Gly-Asp-Glu-Gln-Gly-Glu-Asn-Lys-Cys-Val-Pro-Asn-

521 540  
 Glu-Lys-Tyr-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ala-Phe-Arg-Cys-Leu-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Asp-Val-  
 Ser-Asn-Glu-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ala-Phe-Arg-Cys-Leu-Ala-Glu-Asn-Ala-Gly-

541 560  
 Ala-Phe-Val-Lys-Asn-Asp-Thr-Val-Trp-Glu-Asn-Thr-Asn-Gly-Glu-Ser-Thr-Ala-Asp-Trp-  
 Asp-Val-Ala-Phe-Val-Lys-Asp-Val-Thr-Val-Leu-Gln-Asn-Thr-Asp-Gly-Asn-Asn-Asn-Glu-

561  
Ala-Lys-Asn-Leu-Asn-Arg-Glu-Asp-Phe-Arg-Leu-Leu-Cys-Leu-Asp-Gly-Thr-Arg-Lys-Pro-  
Ala-Trp-Ala-Lys-Asp-Leu-Lys-Leu-Ala-Asp-Phe-Ala-Leu-Leu-Cys-Leu-Asp-Gly-Lys-Arg-

581  
Val-Thr-Glu-Ala-Gln-Ser-Cys-His-Leu-Ala-Val-Ala-Pro-Asn-His-Ala-Val-Val-Ser-Arg-  
Lys-Pro-Val-Thr-Glu-Ala-Arg-Ser-Cys-His-Leu-Ala-Met-Ala-Pro-Asn-His-Ala-Val-Val-

601  
Ser-Asp-Arg-Ala-Ala-His-Val-Lys-Gln-Val-Leu-Leu-His-Gln-Gln-Ala-Leu-Phe-Gly-Lys-  
Ser-Arg-Met-Asp-Lys-Val-Glu-Arg-Leu-Lys-Gln-Val-Leu-Leu-His-Gln-Gln-Ala-Lys-Phe-

621  
Asn-Gly-Lys-Asn-Cys-Pro-Asp-Lys-Phe-Cys-Leu-Phe-Lys-Ser-Glu-Thr-Lys-Asn-Leu-Leu-  
Gly-Arg-Asn-Gly-Ser-Asp-Cys-Pro-Asp-Lys-Phe-Cys-Leu-Phe-Lys-Ser-Glu-Thr-Lys-Asn-

641  
Phe-Asn-Asp-Asn-Thr-Glu-Cys-Leu-Ala-Lys-Leu-Gly-Gly-Arg-Pro-Thr-Tyr-Glu-Glu-Tyr-  
Leu-Leu-Phe-Asn-Asp-Asn-Thr-Glu-Cys-Leu-Ala-Arg-Leu-His-Gly-Lys-Thr-Thr-Tyr-Glu-

661  
Leu-Gly-Thr-Glu-Tyr-Val-Thr-Ala-Ile-Ala-Asn-Leu-Lys-Lys-Cys-Ser-Thr-Ser-Pro-Leu-  
Lys-Tyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Tyr-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Asn-Leu-Lys-Lys-Cys-Ser-Thr-Ser-

681  
Leu-Glu-Ala-Cys-Ala-Phe-Leu-Thr-Arg  
Pro-Leu-Leu-Glu-Ala-Cys-Glu-Phe-Leu-Arg-Lys

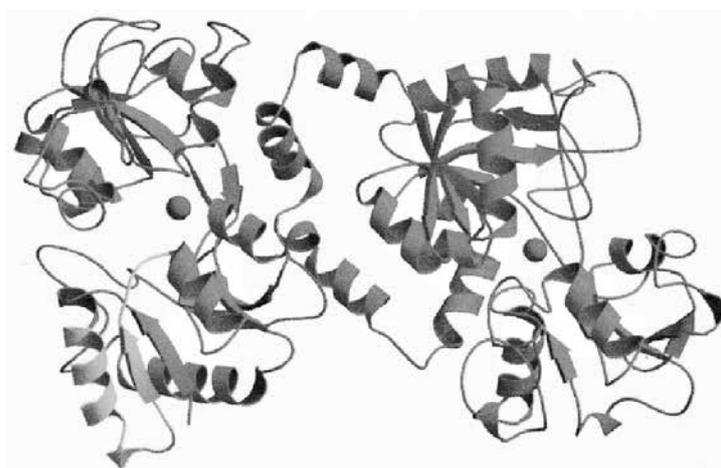


図 1-11 牛乳ラクトフェリン（上段）および人乳ラクトフェリン（下段）の一次構造とそれらの高次構造の模式図

高次構造において 2 個の丸は鉄イオンの結合位置を，巻いたリボン状の領域は  $\alpha$ -ヘリックスを，幅の太い矢印のついた領域は  $\beta$ -シートを表しています。（高次構造の出典：Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. 編 “Advanced Dairy Chemistry Vol. 1” KA/PP (2003)）

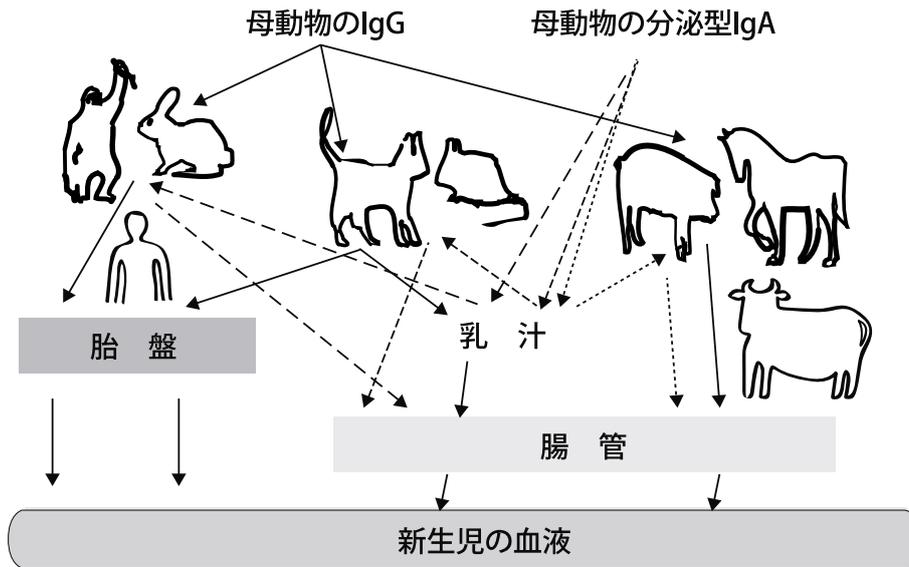
#### 4) ラクトフェリン

ヒトおよびウシの初乳 1kg には，ラクトフェリンが，それぞれ 6～8g および約 1g 含まれます。ヒトおよびウシの常乳には，それぞれ 2～4g および 20～200mg のラクトフェリンが含まれます。

人乳および牛乳のラクトフェリンは乳腺細胞で合成され，図 1-11 に示したように，それぞれ 691 個および 689 個のアミノ酸からなる分子量約 78,000

の糖タンパク質です。人乳ラクトフェリンと牛乳ラクトフェリンのアミノ酸の相同性は約 66% であり，人乳ラクトフェリンでは Asn137 と Asn478 に，牛乳ラクトフェリンでは Asn545 に，糖鎖が結合しています。

ラクトフェリンは，N-末端から数えて 338 番目まで（N-ローブと呼んでいる）とそれ以降（C-ローブと呼んでいる）が構造的に類似しており，両ロー



ヒト新生児の免疫系が完成するまでに約3ヶ月を要すると言われています。そのため、母子免疫と呼ばれる母から新生児への抗体の受け渡しがあります。母子免疫はすべての哺乳動物にありますが、その方法は動物種により違います。

図 1-12 動物種による IgG と IgA の母子免疫の違い

ブのアミノ酸の相同性は約40%です。また、各ローブにはそれぞれ鉄1原子が結合できます。ラクトフェリンに結合した鉄原子はpH2～3の低いpH域でないと解離せず、トランスフェリンに結合した鉄原子がpH5～5.5で解離することと比べれば、ラクトフェリンの鉄結合能は強いことがわかります。しかし、人乳および牛乳中のラクトフェリンの鉄結合量は最大結合量のそれぞれ6～8%および8～30%であり、大部分のラクトフェリンは母乳中で鉄を結合していないアポラクトフェリンとして存在しています。

ラクトフェリンの生体調節機能として、鉄の運搬作用、抗菌作用、細胞増殖促進作用およびIL-1, IL-2, 腫瘍壊死因子(TNF)の放出抑制やIL-8の放出促進を介した免疫系や炎症系の調節作用など多様な機能が知られています。

### 5) 免疫グロブリン

免疫グロブリンと言う呼び名は一般名です。慣用名は抗体です。ヒトの免疫グロブリンは、IgG, IgM, IgA, IgEおよびIgDの5つのクラスに分類されます。表1-3に既に示したように、人乳および牛乳の主要免疫グロブリンはIgG, 分泌型IgA (sIgAや粘膜IgAとも言います。本書では主として粘膜IgAと言います) およびIgMです。これらの免疫グ

ロブリンは母子免疫として新生児の感染防御に寄与していると考えられています。

図1-12に示したように、ウシ、ブタ、ウマでは妊娠中に母親から胎児への免疫グロブリンの移行はなく、すべて初乳を介して与えられます。初乳IgGは腸管から吸収されて血液に移行して新生児の感染防御に寄与します。一方、ヒトやサルでは、IgGは胎盤を通して胎児期に多量に血液に移行します。人乳には多量の粘膜IgAが含まれます。母乳の粘膜IgAは、ヒトでもウシでも乳児の腸管において感染防御に寄与します。

母乳中の免疫グロブリンは、乳腺細胞で合成されたものではなく、血液から移行したものや、乳腺に移動した形質細胞(抗体を産生する細胞)により作られたものです。特に、粘膜IgAは形質細胞で連結鎖(J鎖)を持つ2量体としてつくられたIgAが、乳腺上皮細胞を通過する時に乳腺上皮細胞で作られた分泌片(SC)を結合したものです。IgAを覆う分泌片には、IgAの膜の透過性を高める作用や、腸管のタンパク質消化酵素に対してIgAに抵抗性を持たせる作用があります。

図1-13に、人乳および牛乳の主要免疫グロブリンの模式図を示しました。IgGは、全く同じ2本の重鎖(H鎖)と呼ばれるペプチド鎖と全く同じ2本の軽鎖(L鎖)と呼ばれるペプチド鎖の計4本がジ

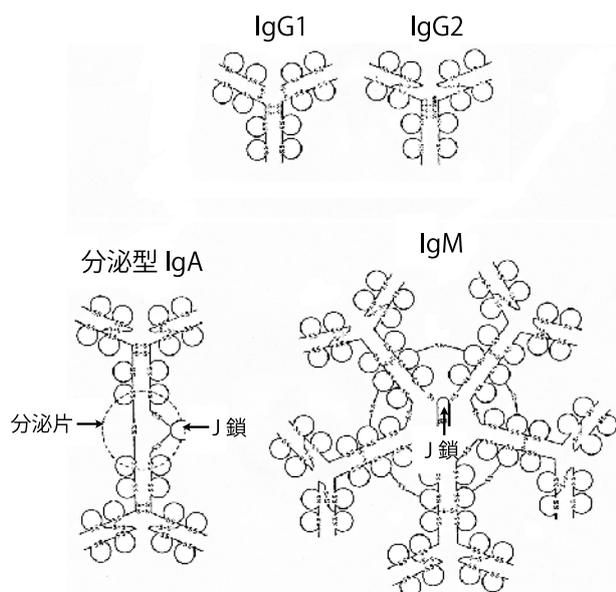


図 1-13 母乳の主要免疫グロブリンの模式図

スルフィド結合で連結してできています。IgG は分子量約 16 万の糖タンパク質です。

粘膜 IgA は、単量体の IgA, 2 分子が、分子量約 16,500 の糖タンパク質である J 鎖によりジスルフィド結合で結ばれ、さらに、IgA の Fc 領域を、タンパク質分解酵素に対して抵抗性のある分子量約 79,000 の糖タンパク質である分泌片が覆ったものです。粘膜 IgA の分子量は約 40 万です。

母乳中の IgM は、単量体の IgM, 5 分子がジスルフィド結合と J 鎖により連結した分子量約 96 万の糖タンパク質です。

## 6) プロテオース・ペプトン

プロテオース・ペプトンとは、母乳を 95～100℃で 20 分間加熱しても沈殿せず、最終濃度が 12% になるようにトリクロロ酢酸（タンパク質凝固剤）を加えた時に沈殿するホエイタンパク質（ペプチド）の総称です。

プロテオース・ペプトンは牛乳タンパク質の 2～6% を占めており、その主要成分はコンポーネント 3, コンポーネント 5, コンポーネント 8-ファースト, コンポーネント 8-スローと呼ばれています。

プロテオース・ペプトンのコンポーネント 3 は、脂肪球皮膜タンパク質の 1 つであり、それ以外は  $\beta$ -カゼインのプラスミン分解物です。そのために、プロテオース・ペプトンをホエイタンパク質から除外する動きがあります。

## 7) 酵素

牛乳タンパク質の中で酵素の占める割合は微量です。しかし、牛乳中の酵素は、牛乳の品質や風味に影響を及ぼすことから、古くから関心が持たれてきました。

酵素は一般に、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼおよびリガーゼに大別されます。人乳や牛乳には、酸化還元酵素と加水分解酵素が多く含まれています。

牛乳や人乳の酵素の多くは、乳腺細胞で作られたものですが、血液から移行したものや、母乳中の白血球が放出したものもあります。

以下に新生児の感染防御に寄与していると考えられる酵素を紹介します。

### a. リゾチーム

リゾチーム (N-アセチルムラミドヒドロラーゼ) は、細菌細胞膜に存在する多糖の主鎖である N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸の  $\beta$ -1,4 結合や N-アセチルグルコサミンの  $\beta$ -1,4 結合物であるキチンの  $\beta$ -1,4 結合を切断します。そのために、細菌の細胞膜は破壊され、細菌は死滅します。

一般に、霊長類や食肉類の母乳にはリゾチームが多く、偶蹄類やゲッ歯類の母乳にはリゾチームは含まれないか、含まれていても微量と言われています。分娩直後の人乳 1kg には約 400mg のリゾチームが含まれます。牛乳のリゾチーム量は通常人乳の 1/3000 程度ですが、ウシが乳房炎になるとリゾチーム量は増加します。

人乳リゾチームは、129 個のアミノ酸からなる分子量約 14,400 のタンパク質です。分子内に 4 個のジスルフィド結合を持つために、耐熱性の高い酵素と言われています。人乳リゾチームと卵白リゾチームの一次構造を比較すると、アミノ酸配列の約 74% に相同性があります。リゾチームには抗菌活性に加えて、免疫溶菌作用の促進、白血球による食菌作用の促進、マウスリンパ球の増殖抑制、炎症組織の修復促進、出血抑制などの機能があります。

### b. ラクトペルオキシダーゼ

ラクトペルオキシダーゼは、過酸化水素の存在下でフェノールや芳香族アミンの酸化を触媒する分子量約 82,000 のポリフィリン様構造を持つ酵素です。

ラクトペルオキシダーゼは、人乳よりも牛乳に多く、牛乳ホエイタンパク質の約1% (30mg/1kg) を占めます。母乳のラクトペルオキシダーゼは、母動物の肝臓や腎臓で作られて母乳に移行したチオシアネートと乳糖の代謝産物である過酸化水素に作用して、ヒポチオシアネート等のシアン化合物を作ります。シアン化合物は細菌の細胞膜を破壊し、細菌を死滅させます。

**c. キサンチンオキシダーゼ**

キサンチンオキシダーゼは、ヒポキサンチンと酸素から尿酸と過酸化水素を作る酵素です。ラクトペルオキシダーゼの抗菌活性の発現には、過酸化水素が必要ですが、牛乳に比較的多く含まれるキサンチンオキシダーゼは、過酸化水素の生産を触媒することにより、ペルオキシダーゼの抗菌活性を促します。

**8) 微量感染防御タンパク質**

感染防御機能が未発達な状態で誕生する新生児のために、母乳、特に初乳には、以下の感染防御タンパク質が含まれています。

**a. 補体**

免疫グロブリンに結合した病原菌は、補体や食細胞の作用により分解されて無毒化されます。補体は9種類のタンパク質 (C1～C9) から構成されていますが、人乳や牛乳には、C3, C4 と呼ばれる補体が含まれています。それらの補体は、何らかの経路で活性化されて新生児の感染防御に寄与していると考えられています。

**b. トリプシンインヒビター**

母乳のトリプシンインヒビターは腸管の主要タンパク質消化酵素であるトリプシンの作用を阻害します。牛乳のトリプシンインヒビターは、67個のアミノ酸と糖鎖からなる分子量約12,000の糖タンパク質です。

胎盤を通してIgGを受け取る動物の母乳よりも、母乳を介してIgGを受け取る動物の母乳に、トリプシンインヒビターが多く含まれることや、初乳から常乳にかけてのトリプシンインヒビターの変動パターンとIgGの変動パターンが似ていることから、母乳中のトリプシンインヒビターは腸管でIgGが消化されるのを阻害し、IgGの感染防御機能を補助していると考えられています。なお、母乳には、抗ウイルス活性を持つチオールプロテアーゼインヒビターも含まれています。

**c. ビタミン B<sub>12</sub> および葉酸結合タンパク質**

牛乳や人乳にはビタミン B<sub>12</sub> 結合タンパク質や葉酸結合タンパク質があります。それらのタンパク質は、ビタミン B<sub>12</sub> や葉酸と結合し、それらの要求性の高い病原菌のビタミンの利用性を抑制します。そのため、病原菌は増殖できません。

**d. 高分子量ムチン様糖タンパク質**

人乳や牛乳にはムチン様糖鎖を持つ分子量40万以上の糖タンパク質があります。それらムチン様糖タンパク質は、ウイルスが新生児の腸管上皮細胞に結合するのを阻害して感染防御に寄与します。

**白石カルシウムの炭酸カルシウム**

**炭酸カルシウムとは？**

古くから食品に使用されている安全性・吸収性に優れたカルシウム源です。用途も栄養強化はもちろんのこと、練製品の弾力増強などの品質改良、粉体の流動性向上・固結防止といった加工助剤などその目的は多彩です。

分散性・混合性に優れたものや、飲料用として沈殿を抑制したタイプ等、品揃えております。

- 一般の栄養強化には「ホワイトン」
- 機能を求めるならば「コロカルソ」
- 飲料用には、スラリー状の「カルエッセン」

詳細につきましては弊社営業担当にお気軽にお尋ねください。

白石カルシウム株式会社

食品部：東京都千代田区岩本町1-1-8 TEL03-3863-8913  
 本社：大阪市北区中之島2-2-7 TEL06-6231-8265

# グルテン – 沈殿要因 –2

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)<sup>1,2</sup> 吉野 精一 (YOSHINO Seiichi)<sup>3</sup>

Key Words: セリアック病, グルテン, グルテンフリー

本論文「グルテン – 沈殿要因 –2」は“Celiac Disease and Gluten” (by Herbert Wieser, Peter Koehler and Katharina Konitzer) 2014 の第 2 章 Gluten- The Precipitating Factor の一部を紹介するものである。

## 3. セリアック病毒性

### 3-1. 毒性のテスト

さまざまな穀物および非穀物原料, 穀物タンパク質およびペプチドの CD 毒性と免疫原性を特定し, 新しい治療法をテストするために, 多数の *in vivo* および *in vitro* の方法が開発された。テストは, (1) CD 患者の生体内チャレンジテスト (2) CD 患者の組織および細胞を用いた *in vitro* テスト (3) 動物モデルテスト<sup>31,32</sup>)に分類できる。テストの前に, 材料は化学分析によって十分に特性評価される必要がある。

#### (1) テストする材料

穀物由来のタンパク質およびペプチド製剤は, 信頼性の高い言明を保証するために, 毒性と免疫原性をテストする前に化学的に特性評価する必要がある。小麦グルテンなどの原材料は, たとえばケルダール法またはデュマ法などを使用して, 窒素の含有量を分析する必要がある。窒素の含有量から, 係数 5.7 によって粗タンパク質含有量に変換できる。グルテン組成は調製または加工の異なる起源と条件によりかなり変化する可能性があるため, プロラミンとグルテリンの割合や不純物の含有量などのタンパク質組成のさらなる研究が望ましい。たとえば, 抽出/液体クロマトグラフィーを組み合わせた手順は, さまざまなタンパク質画分の詳細な分析に使用できる

<sup>33</sup>)。 *in vitro* 試験の場合, タンパク質はペプシン, トリプシン, キモトリプシン, パンクレアチンなどの酵素によって部分的に加水分解され, 消化管消化を模倣し, 不溶性タンパク質を可溶性ペプチドに変換する必要がある。塩が存在する場合 (例えば, 酵素消化中の中和ステップから生じる), 乾燥加水分解物のタンパク質/ペプチド含有量は窒素測定により分析する必要がある。少量の精製タンパク質およびペプチドは, RP-HPLC で定量できる<sup>3)</sup>。計算には, 定義済みのリフェレンスタンパク質 (PWG-gliadin<sup>34</sup>) など) を使用する必要がある。分離または合成されたペプチドは, 純度と同一性を確認する必要がある。この目的には, RP-HPLC と質量分析が推奨される<sup>35)</sup>。

#### (2) *In vivo* 試験

多くの研究者は, *in vivo* 試験が CD 毒性を評価するためのゴールドスタンダードであることに同意する。これは, 数年間 GFD (Gluten-free diet) を使用しているセリアックボランティアで実施されるため, 小腸の形態が正常であることが期待される。最初に, CD 患者は, 摂食試験に続いてキシロースと脂肪の吸収不良を測定するか, 脂肪便などの症状を監視することにより, 穀物製品と粗タンパク質画分に挑戦した<sup>36)</sup>。ただし, これらのテストは, チャレンジの素材の最適量和チャレンジの最適の期間が不確実

<sup>1</sup> 神戸女子大学, <sup>2</sup> 日本穀物科学研究会前会長, <sup>3</sup> 辻調理専門学校

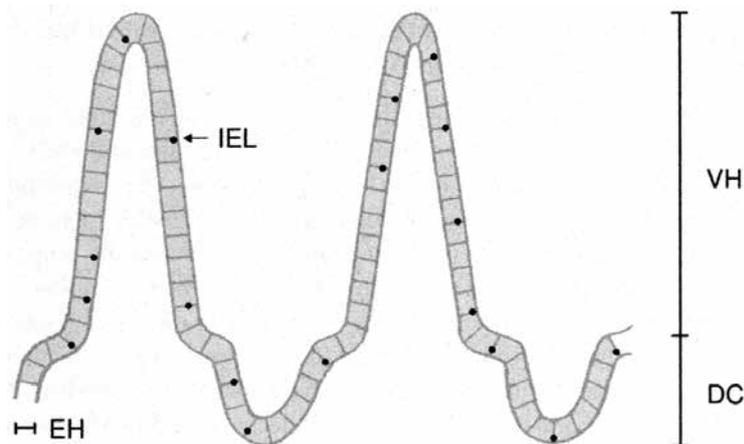


図 2.15 腸上皮の概略図および *in vivo* 毒性の測定に使用される要因の表示 (IEL, 上皮内リンパ球; EH, 腸細胞の高さ; VH, 絨毛の高さ; DC, 陰窩の深さ)

性的ために満足を与えるものではないと見なされている。さらに、キシロース吸収不良および脂肪バランスへの影響は二次的であり、上皮表面での反応に関する情報を与えない。ほとんどの研究では、わずかな CD 患者のみが検査され、対照は含まれていなかった。1970 年代に、腸の生検の技術が導入され、患者とコントロールのより大きなグループで挑戦され、毒性に関するより正確な結論に至った。オートムギ毒性に関する Janatuinen と研究者の *in vivo* 研究は、試験成績の例かもしれない<sup>37)</sup>。彼らは、一定量のオートムギを含む選択された食事で挑戦された CD 患者について無作為に研究を行った。評価の主な方法は、特別な食事の適用の前の十二指腸生検と、およびそれらのテスト後の血清学的検査であった。患者 ( $n=92$ ) は、オートミールを食べるグループとコントロールグループに分けられた。オートムギグループの患者は、6 ヶ月または 12 ヶ月間、1 日あたり約 50g のオートムギを摂取した。完了すると、その後の組織学的および形態計測的測定と血清学的検査を伴う十二指腸生検が行われた。このような広範なテストは、大量に入手可能な材料（穀物、小麦粉、小麦グルテンなど）でのみ実行できるが、調製が困難な精製タンパク質やペプチドでは実行できない。寛解期（治療中）の CD 患者の小腸への直接注入による経口チャレンジの導入、それに続く試験の開始時および数時間後の生検により、タンパク質およびペプチドの量を約 1g に<sup>38)</sup> さらに少なく減らすことができた<sup>35,39)</sup>。

例として、グリアジンペプチド  $\alpha 56-75$  を使用した生体内試験は、次のプロセスで説明されている<sup>35,39)</sup>：

Quinton<sup>®</sup> 油圧式、複数生検カプセルにカニューレを取り付けた。カプセルは、蛍光透視下で鎮静された CD 患者の十二指腸遠位に配置された。消化性トリプシンタンパク質消化物またはグルテンペプチドの溶液は、シリンジドライバーによって 2 時間十二指腸に注入される。注入前および注入開始の 2, 4, 6 時間後に生検を行う。その後、組織をカプセルから取り出し、形態計測分析のためにホルマリンで固定する。組織の一部は部分的に染色され、一部は瞬間凍結される。染色切片の絨毛の高さ、陰窩の深さ、および腸細胞の高さを測定する。凍結切片を使用して、特殊な抗体検査により腸細胞 100 個あたりの上皮内リンパ球 (IEL) の数を測定する。絨毛の高さ、絨毛の高さと陰窩の深さの比率、および IEL の数の変化は、毒性評価の信頼できるパラメーターであると考えられている (図 2.15)<sup>35)</sup>。

侵襲的な生検検査を避けるために、CD 毒性の可能性のある薬剤による経口投与後の腸透過性の測定または末梢血 T 細胞の検査を使用して検査することができる。透過性試験は、血液循環に対する腸の障壁を特異的に通過するオリゴ糖（例えばラクツロース）と単糖（例えばマンニトール）の経口投与に基づいている<sup>40)</sup>。小さい分子（単糖）はバリア機能の喪失とは無関係に、腸のバリアを自由に通過することを考えたのに対し、より大きな分子（オリゴ糖）はバリア機能の喪失中のみ通過する。経口摂取後 5～6 時間に収集された尿サンプル中の両方の糖類の比率は、バリア機能の損失、したがって、テストされた薬剤の CD 毒性を反映すると考えられる。ただし、14 日間、3.0 または 7.5g グルテン/日

にチャレンジした GFD で 20 人の CD 患者を用いた *in vivo* 試験では、ラクツロースとマンニトールの比率に有意な変化は見られなかったが、生検形態、抗体価、および胃腸症状大多数の患者で変化した<sup>41)</sup>。したがって、糖とタンパク質/ペプチドに対する異常な腸管透過性の間の相関の程度は確立されていない。

血液検査に関して、CD が確認された患者は、検査対象の薬剤で 3 日間の経口チャレンジを受ける。末梢血単核細胞 (PBMC) は数日後に分離され、薬剤 (ペプチドまたはタンパク質) とインキュベートされる<sup>42)</sup>。インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 応答は、サイトカイン特異的アッセイにより測定される。直腸は粘膜組織を取得するためのアクセスが容易な部位を提供するため、局所グルテン攻撃に対する反応が調査された<sup>43)</sup>。2g のグルテン消化物で攻撃された CD 患者の直腸粘膜は、粘膜固有層の著しい腫脹、マスト細胞の急速な低下、IEL の顕著な上昇、および粘膜固有層のリンパ球の実質的な浸潤を示した。これらの観察は、直腸粘膜がグルテンに感作されていることを示しており、したがって、調査および診断の目的に便利なアプローチを提供した。

### (3) *In vitro* 試験

毒性を試験するための *in vitro* システムの開発は、少量 ( $\approx 1\text{mg}$  以下) の試験ができるため、純粋なタンパク質およびペプチドの研究における重要なステップである。CD 患者の腸組織の器官培養は、最も信頼性の高い *in vitro* モデルであることが提案されており、*in vivo* 状況を反映している可能性がある。このテストは、1969 年に Browning and Trier によって最初に導入された<sup>44)</sup>。CD 患者の組織は、診断手順の一部として採取され、テスト対象のタンパク質またはペプチドを含む培地でインキュベートされる<sup>45)</sup>。長期培養後の粘膜形態の質の保証はないが、生検は培養システム内で 24 ~ 48 時間またはそれ以上継続することができる<sup>31)</sup>。元々、活動的な CD 患者の生検が行われ、組織は培養液のみで酵素活性、炎症の徴候、および形態の改善を示したが、CD 毒性物質の存在下では認められなかった。現在、寛解期の患者の組織は潜在的に有毒な物質とインキュベートされ、サイトカイン (例: IFN- $\gamma$ , インターロイキン (IL) -4, IL-10) および一酸化窒素などの CD 特異的効果のマーカーが測定される。この方法の利点

の 1 つは、治療を受けた患者の生検で CD に特徴的なさまざまな特徴を再現できるため、研究者が CD の開発に関係するメカニズムを発見できることである<sup>31)</sup>。腸生検には腸細胞と粘膜固有層が含まれているため、このモデルは生得応答と適応応答の両方を判断するのに役立つ。欠点として、器官培養システムはハイスループット法ではなく、組織が循環、神経系、およびリンパ器官への接続のないことだ。器官培養システムは、毒性効果を検出するための最良の *in vitro* モデルだが、免疫原性効果のみを特定する T 細胞に関する研究に広く置き換えられている。1990 年代から、小腸粘膜または CD 患者の末梢血からの T 細胞株およびクローンが、タンパク質およびペプチドの免疫原性効果を測定し、潜在的な新規治療形態をテストするために使用されてきた<sup>46)</sup>。グルテンに対して産生された T 細胞株とクローンは、多数の実験を行うのに役立つ。刺激に対する T 細胞の反応を容易に実証する。グルテン感受性 T 細胞は、*in vitro* で培養および刺激された腸の生検から分離できる<sup>46)</sup>、または 3 日間の経口グルテンチャレンジ後 6 日目に治療を受けた CD 患者の血液に見られる<sup>42)</sup>。頻繁に使用されるテストは、抗原提示細胞 (APCs) (例えば B 細胞) およびトリチウム化チミジンの存在下で TG2 で処理された推定抗原 (約 100 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と腸の CD 感受性 T 細胞のインキュベーションによって実行される T 細胞増殖アッセイである。シンチレーション測定によって決定された T 細胞の増殖は、免疫原性効果のパラメーターである。さらに、IFN- $\gamma$  または IL の産生を測定できる。T 細胞検査は、免疫原性効果のレベルを比較するために広く使用されている。たとえば、異なるグリアジンペプチド<sup>47)</sup> およびオートムギ栽培品種<sup>48)</sup> (表 2.8) とのインキュベーション後、SI (刺激指数、抗原の 1 分あたりのカウントを抗原なしの 1 分あたりのカウントで割った値) および IFN- $\gamma$  濃度を測定するために増殖アッセイを適用した。T 細胞の感度は大きく変化し、刺激を受けた患者と刺激の手順に依存するため、参照グルテンタンパク質またはペプチドを比較のために摂取する場合、相対的な値のみを決定できる。

グルテン感受性クローンからではなく、複数の CD 患者からのグルテン感受性 T 細胞株の使用が推奨されている<sup>49)</sup>。

表 2.8 異なる栽培品種からのグリアジン消化物, グリアジンペプチド, およびアベニン消化物に対するグルテン感受性 T 細胞の反応性 (47, 48)<sup>a</sup>

Sample	SI	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
PT-gliadin	7	9
Peptide G9 ( $\alpha$ 56-75/E65)	37	180
Peptide G5 ( $\alpha$ 56-68/E65)	2	23
Peptide G4 ( $\alpha$ 62-75/E65)	12	55
PTC-gliadin	1.8	9.4
PTC-avenin OF 720	0.7	3.4
PTC-avenin OH 727	1.0	4.8
PTC-avenin OM 719	1.3	7.9

<sup>a</sup>SI, stimulation index; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; PT, peptic-tryptic; PTC, peptic-tryptic-chymotryptic.

グルテンに敏感な T 細胞は腸組織ではまれなので、直接評価することはできない。十分に高い頻度で新鮮なポリクローナルグルテン感受性 T 細胞の唯一の既知のソースは、短期経口グルテンチャレンジの直後に採取された CD ドナーからの末梢血である<sup>42)</sup>。グルテン攻撃の数日後に収集された CD 患者の末梢血単核細胞は、96 ウェルプレートを使用して潜在的な抗原とインキュベートされる。IFN- $\gamma$  の放出は自動リーダーによってカウントされ、グルテンタンパク質の免疫原性 T 細胞エピトープの包括的なマッピングが可能になる<sup>50)</sup>。一般に、T 細胞は腸内に存在する他の細胞タイプとの関連性がないため、*in vivo* で小腸に必ずしも影響しないことを言及する必要がある。さらに、T 細胞は抗原に対する反応が異なることが多いため、異なる患者の複数の T 細胞株を同時に適用する必要がある。さらに、免疫原性は、*in vivo* または器官培養試験で示される毒性に常に対応するとは限らない。例えば、オートムギのプロラミン画分であるアベニンは、T 細胞試験では免疫原性を示すが、器官培養試験では非毒性であることが示された<sup>51, 52)</sup>。

皮膚試験、ヒト K562 (S) 細胞による凝集試験、白血球遊走阻害試験、またはマクロファージ凝血促進活性試験などの難易度の低いスクリーニングアッセイは、一般に受け入れられていない。1990 年代以来、2つの上皮細胞培養モデル、T84 細胞と Caco-2 細胞が、CD 特有の効果をテストするためのモデルとして使用されてきた<sup>31)</sup>。T84 細胞は結腸癌の肺転移に由来する。この細胞株は結腸起源だが、高分子およびイオンに対する腸上皮透過性の研究に広く使用されている。T84 細胞は、CD の病因の研

究、例えば、自然免疫反応<sup>53)</sup> および腸管透過性への影響<sup>54)</sup> の研究にも応用されている。Caco-2 細胞は、比較的高分化したヒト結腸腺癌に由来する。コンフルエンスに達すると、細胞は自発的に分化し、先端表面が微絨毛で覆われた分化した腸細胞の超微細構造形態を保持する。Caco-2 細胞は、タイトジャンクションと、腸の内側の細胞に特徴的な多くの酵素とトランスポーターを含んでいる<sup>55)</sup>。これらの特性により、Caco-2 細胞は腸上皮バリアのモデルとして、および CD に関連する研究で広く使用されている。例えば、それらは個々のペプチドがどのように処理されるか<sup>56)</sup>、CD 患者の抗体が疾患の病因にどのように関与するか<sup>57)</sup> を明らかにするために使用されてきた。

#### (4) 動物モデル

ヒトの腸内物質とは別に、グリアジン画分の細胞毒性活性を実証するために、ラットまたはヒヨコ胎児の未熟腸の培養物が使用されている<sup>58, 59)</sup>。CD 活性化合物は、非常に未熟な小腸の発生と形態形成を阻害し、グリアジンペプチドがその形態形成の初期段階で小腸粘膜に対して直接的な損傷活性を有する可能性があることを示す。別のアプローチは、活性グリアジンペプチドによって引き起こされるラット肝臓リソソームの破壊研究である<sup>60)</sup>。

CD の免疫学的経路とメカニズムをよりよく理解するために、さまざまな目的の動物モデルを作成するために多くの試みが行われた。現在、グルテン依存性下痢を自発的に生成する 3つのモデルがある：(1) 犬、(2) アカゲザル、および (3) 馬モデル<sup>32, 61)</sup>。犬モデルでは、アイリッシュセッターはグルテ

ンの消費に応じて部分的な絨毛萎縮と IEL（上内皮リンパ球）浸潤を発症する<sup>62)</sup>。アカゲザルではグルテン依存性の小腸粘膜損傷が報告されており<sup>63)</sup>、炎症性小腸疾患のウマではグルテン依存性の抗体レベルの上昇が観察されている<sup>64)</sup>。これら3つの自発的モデルすべてに共通するのは、HLA-DQ 2/8 対立遺伝子との関連性の欠如である。他のモデル（マウス、ラット、ウサギなど）は自発的ではなく、グルテン感作、化学的および/または薬物治療、および CD の機能を発症するための遺伝子改変が必要である。マウスモデルは、特定の遺伝子の CD の発症への寄与を評価するために導入遺伝子を導入できるため、他のモデルよりも大きな利点がある。例えば、ヒト HLA-DQ2 または -DQ8 を発現するトランスジェニックマウスが生成されたが、使用された動物のいずれも本格的な絨毛萎縮を発症しなかった<sup>65)</sup>。デ・パオロと共同研究者は、グリアジンを与えられたヒト化 HLA-DQ8 マウスが固有層で IL-15 を過剰発現していることを報告した。ただし、粘膜構造は正常のままである<sup>67)</sup>。多くの研究でトランスジェニックマウスを使用して、CD 病因のさまざまな要素（CD4+T 細胞、TG2、IL-15、腸内微生物叢の役割など）を調査した<sup>32,61)</sup>。特定のマウスモデルは、CD の新規治療法のテストにも使用された<sup>32)</sup>。病原性ステップを標的とする例は、グルテンペプチドの修飾、自然反応の抑制、ゾヌリン -1、炎

症性 T 細胞応答の抑制、および IL-15 または IL-15 の受容体の遮断である。これらすべての試みに関係なく、この障害のすべての側面を再現する CD の動物モデルはまだ開発を待っている。

(5) 毒性レベル

穀物、タンパク質画分とタイプ、およびペプチドの CD 毒性レベルに関する推測を多くの論文が提供している。たとえば、六倍体の普通小麦は、最も毒性の強い穀物として頻繁に説明されている。二倍体および四倍体の小麦種は、六倍体の普通小麦よりも毒性が低いことが示唆された<sup>68-70)</sup>。グリアジンはグルテニンよりも毒性が強い傾向がある<sup>36)</sup>。グリアジン内では、α-グリアジンが最も毒性が強く、γ-グリアジンと ω-グリアジンの毒性が低いことが提案された<sup>71-73)</sup>。D ホルデインと C ホルデインはホルデインの中で最も免疫原性が高いことがわかった<sup>74)</sup>。多数の報告が、α2-グリアジンからの 33 量体ペプチドがグルテンペプチド内の最も重要な免疫原性物質であることを強調している。これらの仮定はすべて正当化されているか、CD の毒性と免疫原性のレベルを決定することはまったく可能か？意欲的な患者の数が限られていること、毒性効果を生み出すのに必要な薬剤の量が比較的多いこと、実験の労力が大きいため、毒性レベルの統計的に有意な評価のために生体内チャレンジを考慮することはできない

表 2.9 ペプチド α31-49 および 5 つのアラニン (A) 置換ペプチド変異体、フレイザー画分 FIII (FFIII), およびオвалブミン (OVA) で培養された検体の腸細胞高さ (μm)<sup>75)</sup>

Patient	Peptide							
	FFIII	α31-49	A31	A36	A38	A39	A42	OVA
1	-7.9	-6.7	-6.3	-11.5	4.4	-1.6	3.8	0.7
2	-9.5	-6.5	1.8	9.0	-6.2	6.0	10.6	4.2
3	-13.3	-9.6	-13.7	-8.4	-1.4	-0.8	-2.5	-0.2
4	-12.3	-18.6	-5.8	-9.4	1.5	-0.4	-1.3	-1.9
5	-7.5	2.0	-3.7	-1.6	13.1	10.5	6.0	2.7
6	-12.5	-15.5	-1.2	-1.6	0.7	-2.4	-7.3	-6.9
7	-11.8	-10.9	-3.0	-2.4	1.1	1.2	0.9	-1.6
8	-17.7	-9.7	-12.1	-18.8	-5.4	-1.8	-3.8	-3.2
9	-6.6	n.t.	-0.1	6.7	n.t.	9.0	7.3	-1.6
10	-4.1	n.t.	n.t.	n.t.	-1.7	n.t.	n.t.	2.8
Mean	-10.3	-9.4	-4.9	-3.9	0.7	2.2	1.5	-0.5

n.t. = not tested.

い。対照的に、CD患者に由来する小腸生検の臓器培養は、毒性効果の違いを測定する可能性を提供する。寛解期の患者の組織は潜在的に有毒な物質とインキュベートされ、酵素活性、形態的特徴、サイトカイン濃度などのCD特異的効果のマーカーを測定できる。陽性および陰性の対照物質を実験に含める必要がある。例として、ペプチド  $\alpha$ 31-49 と 10 人の CD 患者の検体で試験した 5 つのアラニン置換変異体の検査を表 2.9 に示した<sup>75)</sup>。フレイザーの画分 FIII (小麦グルテンの消化性トリプシン消化物の水溶性部分) およびオボアルブミンをそれぞれ陽性および陰性コントロールとして使用し、培地のみと比較した腸細胞の高さの変化 (図 2.15) を毒性のマーカーとして使用した。結果は、非修飾ペプチド  $\alpha$ 31-49 は、陽性対照と同程度の毒性があった。ペプチド  $\alpha$ 31-49/A31 および  $\alpha$ 31-49/A36 は毒性が低かった。また、ペプチド  $\alpha$ 31-49/A38,  $\alpha$ 31-49/A39, および  $\alpha$ 31-49/A42 は非毒性だった。

器官培養システムが多種多様な細胞タイプを含み、生体内の状況を反映していることを考えると、この方法が少数の研究でしか使用されていないことは驚くべきことである。

対照的に、CD患者の小腸粘膜および末梢血から得られたグルテン感受性 T 細胞による検査は、CD 特異的免疫原性効果の評価に広く使用されている。表 2.8 に例を示した。ただし、T 細胞株とクローンの感度と特異性は、いくつかのパラメーター (例えば、それらが採取された患者や刺激に使用される薬剤) に強く依存している。一部の T 細胞は特定のグルテンペプチドに高度に特異的だが、他の T 細胞は相同ペプチドと交差反応し、これらの T 細胞間の比率は患者ごとに異なる<sup>76)</sup>。これらの制限を克服するために、T 細胞クローンではなく、異なる患者からの複数の同時 T 細胞株の適用が推奨されている<sup>49)</sup>。

## References

31. Lindfors K., Rauhavirta T., Stenman S., Maeki M., Kaukinen K. *In vitro* models for gluten toxicity: relevance for celiac disease pathogenesis and development of novel treatment options. *Exp Biol Med*. 2012; **237**:119-125. 32. Stoven S., Murray J.A., Marietta E.V. Latest *in vitro* and *in vivo* models of celiac disease. *Expert Opin Drug Discov*. 2013; **8**: 445-457.
33. Wieser H., Antes S., Seilmeier W. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem*. 1998; **75**: 644-650.
34. vanEckert R., Berghofer E., Ciclitira P.J., Chirido F., Denery-Papini S., Ellis H.J. *et al.*: Towards a new gliadin reference material - isolation and characterisation. *J Cereal Sci*. 2006; **43**: 331-341.
35. Fraser J.S., Engel W., Ellis H.J., Moodie S.J., Pollock E.L., Wieser H. *et al.*: Coeliac disease: *in vivo* toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut*. 2003; **52**: 1698-1702.
36. Shewry P.R., Tatham A.S., Kasarda D.D. Cereal proteins and coeliac disease. In: Marsh M.N., ed. *Coeliac disease*. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications; 1992: 305-348.
37. Janatuinen E.K., Pikkariainen P.H., Kempainen T.A., Kosma V.M., Jarvinen R.M., Uusitupa M.J. *et al.*: A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med*. 1995; **333**: 1033-1037.
38. Hekkens W.T.J.M., Haex A.J.C., Willighagen R.G.J. Some gliadin fractionation and testing by a method. In: Booth C.C., ed. *Coeliac (UK)*: Churchill Livingstone; 1970: 11-19.
39. Sturgess R., Day P., Ellis H.J., Lundin K.E.A., Gjertsen H.A., Kontakou M. *et al.*: Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*. 1994; **343**:758-761.
40. Grootjans J., Thuijls G., Verdam F., Derikx J.P., Lenaerts K., Buurman W.A. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg*. 2010; **2**: 61-69.
41. Leffler D., Schuppan D., Pallav K., Najarian R., Goldsmith J.D., Hansén J. *et al.*: Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*. 2013; **62**: 996-1004.
42. Anderson R.P., vanHeel D.A., Tye-Din J.A., Barnardo M., Salio M., Jewell D.P. *et al.*: T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut*. 2005; **54**: 1217-1223.
43. Loft D.E., Marsh M.N., Sandle G.I., Crowe P.T., Garner V., Gordon D. *et al.*: Studies of intestinal lymphoid tissue. XII. Epithelial lymphocyte and disease. Edinburgh, aspects of histochemical London mucosal responses to rectal gluten challenge in celiac sprue. *Gastroenterology*. 1989; **97**: 29-37.
44. Browning T.H., Trier J.S. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. *J Clin Invest*. 1969; **48**: 1423-1432.
45. Shidrawi R.G., Day P., Przemioslo R., Ellis H.J., Nelufer J.M., Ciclitira P.J. *In vitro* toxicity of gluten peptides in celiac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol*. 1995; **30**:758-763.
46. van de Wal Y., Kooy Y.M.C., van Veelen P.A., Pena S.A., Mearin L.M., Molberg O. *et al.*: Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; **95**: 10050-10054.

47. Ellis H.J., Pollock E.L., Engel W., Fraser J.S., Rosen-Bronson S., Wieser H. *et al.*: Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut*. 2003; **52**: 212-217.
48. Comino I., Real A., deLorenzo L., Cornell H., Lopez-Casado M.A., Barro F. *et al.*: Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*. 2011; **60**: 915-922.
49. Suligoj T., Gregorini A., Colomba M., Ellis H.J., Ciclitira P.J. Evaluation of the safety of ancient strains of wheat in coeliac disease reveals heterogeneous small intestinal T cell responses suggestive of coeliac toxicity. *Clin Nutr*. 2013; **32**: 1043-1049.
50. Tye-Din J.A., Stewart J.A., Dromei J.A., Beissbarth T., van Heel D.A., Tatham A. *et al.*: Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med*. 2010; **2**: 41-51.
51. Kilmartin C., Lynch S., Abuzakouk M., Wieser H., Feighery C. Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following *in vitro* culture. *Gut*. 2003; **52**: 47-52.
52. Kilmartin C., Wieser H., Abuzakouk M., Kelly J., Jackson J., Feighery C. Intestinal T cell responses to cereal proteins in coeliac disease. *Dig Dis Sci*. 2006; **51**: 202-209.
53. Maiuri L., Luciani A., Vilella V.R., Vasaturo A., Giardino I., Pettoello-Mantovani M. *et al.*: Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR $\gamma$  downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*. 2010; **59**: 311-319.
54. Bethune M.T., Siegel M., Howles-Banerji S., Khosla C. Interferon- $\gamma$  released by gluten-stimulated coeliac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; **329**: 657-668.
55. Lammers K.M., Lu R., Brownley J., Lu B., Gerard C., Thomas K. *et al.*: Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008; **135**: 194-204.
56. Barone M.V., Nanayakkara M., Paoletta G., Maglio M., Vitale V., Troiano R. *et al.*: Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation. *PLoS One*. 2010; **5**: e12246.
57. Luebbing N., Barone M.V., Rudloff S., Troncone R., Auricchio S., Zimmer K.P. Correction of gliadin transport within enterocytes through coeliac disease serum. *Pediatr Res*. 2011; **70**: 357-362.
58. Wood G.M., Howdle P.D., Losowsky M.S. Organ culture of fetal rat small intestine for testing gluten toxicity: a reappraisal. *Br J Exp Pathol*. 1987; **68**: 25-34.
59. Mothes T., Osman A.A., Seilmeier W., Wieser H. The activity of single gliadin components in a fetal chick intestine assay for coeliac disease. *Eur Food Res Technol*. 1999; **210**: 93-96.
60. Cornell H.J., Townley R.R.W. Effect of gliadin peptides on rat-liver lysosomes in relation to the pathogenesis of coeliac disease. *Clin Chim Acta*. 1973; **49**: 181-188.
61. Marietta E.V., Murray J.A. Animal models to study gluten sensitivity. *Semin Immunopathol*. 2012; **34**: 497-511.
62. Hall E.J., Batt R.M. Dietary modulation of gluten sensitivity in a naturally occurring enteropathy of Irish setter dogs. *Gut*. 1992; **33**: 198-205.
63. Bethune M.T., Borda J.T., Ribka E., Liu M.X., Phillippi-Falkenstein K., Jandacek R.J. *et al.*: A non-human primate model for gluten sensitivity. *PLoS One*. 2008; **3**: e1614.
64. vanderKolk J.H., vanPutten L.A., Mulder C.J., Grinwis G.C.M., Reijm M., Butler C.M. *et al.*: Gluten-dependent antibodies in horses with inflammatory small bowel disease (ISBD). *Vet Q*. 2012; **32**: 3-11.
65. deKauwe A.L., Chen Z., Anderson R.P., Keech C.L., Price J.D., Wijburg O. *et al.*: Resistance to coeliac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol*. 2009; **182**: 7440-7450.
66. D'Arienzo R., Stefanile R., Maurano F., Luongo D., Bergamo P., Mazzarella G. *et al.*: A deregulated immune response to gliadin causes a decreased villous height in DQ8 transgenic mice. *Eur J Immunol*. 2009; **39**: 3552-3561.
67. dePaolo R.W., Abadie V., Tang F., Fehlner-Peach H., Hall J.A., Wang W. *et al.*: Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature*. 2011; **471**: 220-224.
68. Auricchio S., de Ritis G., de Vincenzi M., Occorsio P., Silano V. Effects of gliadin-derived peptides from bread and durum wheats on small intestine cultures from rat fetus and coeliac children. *Pediatr Res*. 1982; **16**: 1004-1010.
69. Vincentini O., Maialetti F., Gazza L., Silano M., Dessi M., de Vincenzi M. *et al.*: Environmental factors of coeliac disease: cytotoxicity of hulled wheat species *Triticum monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicocum* and *T. aestivum* ssp. *spelta*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; **22**: 1816-1822.
70. vandenBroeck H., Hongbing C., Lacaze X., Dusautoir J.C., Gilissen L., Smulders M. *et al.*: In search of tetraploid wheat accessions reduced in coeliac disease-related gluten epitopes. *Mol Biosyst*. 2010; **6**: 2206-2213.
71. Frisoni M., Corazza G.R., Lafiandra D., deAmbrogio E., Filipponi C., Bonvicini F. *et al.*: Wheat deficient in gliadins: promising tool for treatment of coeliac disease. *Gut*. 1995; **36**: 375-378.
72. Spaenij-Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., van Veelen P., Drijfhout J.W., Jonker H., van Soest L. *et al.*: Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for coeliac disease patients. *Gastroenterology*. 2005; **129**: 797-806.
73. Carroccio A., diPrima L., Noto D., Fayer F., Ambrosiano G., Villanacci V. *et al.*: Searching for wheat plants with low toxicity in coeliac disease: between direct toxicity and immunologic activation. *Dig Liver Dis*. 2011; **43**: 34-39.
74. Tanner G.J., Howitt C.A., Forrester R.I., Campbell P.M., Tye-Din J.A., Anderson R.P. Dissecting the T-cell response to hordeins in coeliac disease can develop barley with reduced immunotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; **32**: 1184-1191.
75. Biagi F., Ellis H.J., Parnell N.D., Shidrawi R.G., Thomas P.D., O'Reilly N. *et al.*: A non-toxic analogue of a coeliac-activating gliadin peptide: a basis for immunomodulation? *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; **13**: 945-950.
76. Koning F. Coeliac disease: quantity matters. *Semin Immunopathol*. 2012; **34**: 541-549.

城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

## タラノキ *Aralia elata* (Miq.) Seem. (ウコギ科 Araliaceae)

連絡先：城西大学薬学部  
shiratak@josai.ac.jp

梅雨明け間近，真夏の暑い太陽がジリジリと照り付ける頃，空に向かって勢いよく葉を広げている木があります。タラノキ（<sup>そうぼく</sup>楸木）はタランボ，オニノカナボウ，タラッペなどともよばれ，特に春先は山菜として親しまれ，新芽は「たらのめ（楸芽）」といい，てんぷら等にして食されます。タラノキは北海道，本州，四国，九州，沖縄のほか，朝鮮半島，中国，千島列島，サハリンなど，東アジア地域の山野に広く分布する落葉低木で樹木が伐採された跡地や林道脇の日当たりのよい場所によく見られます。成長は早く，1年で20～60 cmも伸び，5年で3 m位に達します。幹はあまり枝分かれせず，まっすぐに立ち，樹皮には幹から垂直に伸びる多くの棘<sup>とげ</sup>があります。葉は互生で幹の先端にだけ集中し，葉身は奇数2～3回羽状複葉，高さ50～100 cm，全体に草質でつやはありません。葉柄は長さ15～30 cmで基部がふくらみ，小葉は卵形から楕円



写真1 タラノキ（花1）



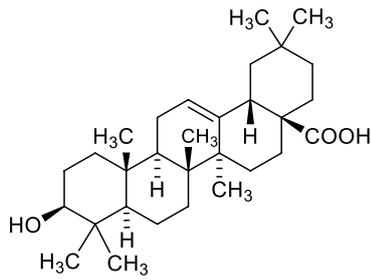
写真2 タラノキ（花2）



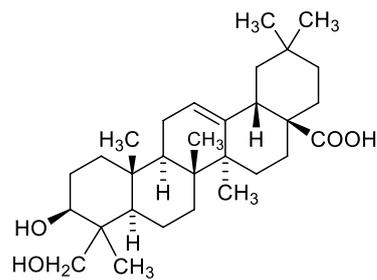
写真3 タラノキ（果実）



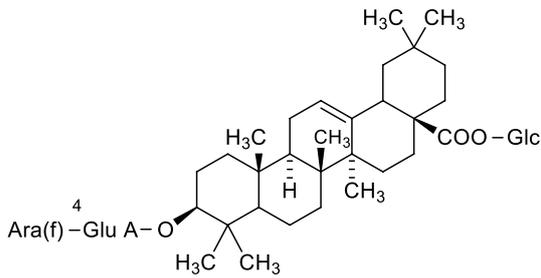
写真4 タラノキ（芽）



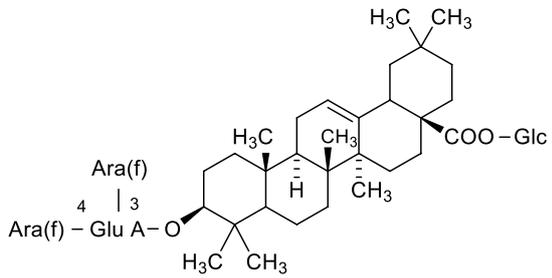
oleanolic acid  
CAS No. 508-02-1



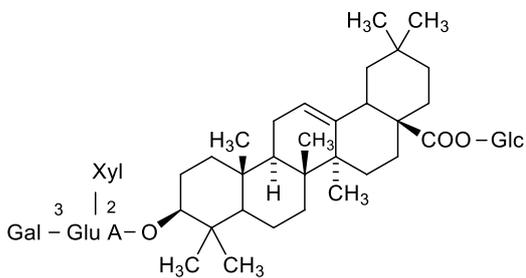
hederagenin  
CAS No. 465-99-6



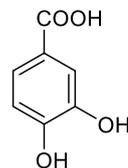
araloside A (=chikusetsusaponin IV)  
CAS No. 7518-22-1



araloside B  
CAS No. 7518-23-2

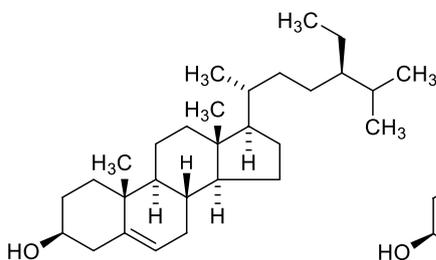


elatoside A  
CAS No. 155836-04-7

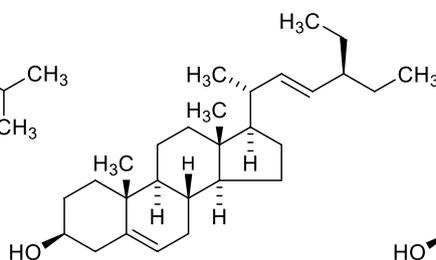


protocatechuic acid  
CAS No. 99-50-3

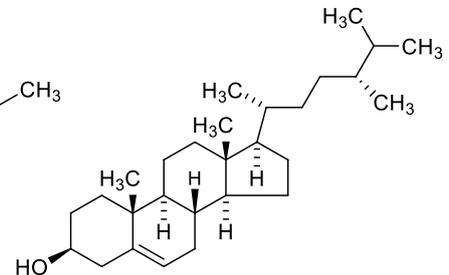
Glc : glucopyranose  
Glu A : glucuronic acid  
Ara(f) : arabinofuranose  
Gal : galactopyranose  
Xyl : xylopyranose



$\beta$ -sitosterol  
CAS No. 83-46-5



stigmasterol  
CAS No. 83-48-7



campesterol  
CAS No. 474-62-4

図1 成分の構造式



写真5 タラノキ（樹皮）



写真6 タラの芽（天ぷら）



写真7 生薬 タラコンピ 櫛根皮（左）、棘（中央）、樹皮（右）



写真8 生薬 タラコンピ 櫛根皮（刻み）

形で長さ5～12 cm、葉の裏は白色で葉縁に鋸歯があります。葉の出始めは全体に毛が多いのですが、次第に少なくなり夏頃には柄と葉脈上に粗い毛が残るだけになります。夏、茎頂に小さな散形花序が多数集まった30～50 cmほどの複円すい状花序をつけ、多数の小さな白い花を咲かせます。花卉は5枚、先がとがり、やや丸みをおびた三角形をしており、雄しべは5本で突き出ています。自家受粉を防ぐため、雄しべが先に熟して落ちた後、5個の雌しべが熟し、秋に黒色で球状の液果となります。分類上は幹に棘が少なく葉の裏に毛が多くて白くないものをメダラ var. *subinermis* (= var. *canescens*) といい、栽培されるものはむしろこちらの方が普通です。

タラの芽の採取方法は、新芽の根元でむしり取ります。時期は桜（ソメイヨシノ）の8分咲きの頃（関東の平地では3月中旬）がちょうどよく、採取は先端から上に向けた1番の芽と2番程度とするのがよいでしょう。側芽まで取ってしまうとその枝は枯れてしまいます。調理方法は、若芽をてんぷらにするのが一般的で、口いっぱい広がる独特の風味は何とも言えません。また、単にゆがいておひたしやゴマ和え、油炒めも結構いけます。

生薬としては、6～8月に根皮、樹皮を採取し、水洗後、刻んで日干しにします。タラノキの根の皮をタラコンピ（タラ根皮, *Arariae Radicis Cortex*）といい、成分としては、タラコンピからトリテルペンの *oleanolic acid* をアグリコンとするサポニンの *aralosite A* (= *chikusetsusaponin IV*), *B*, *elatoside A*, フェノールカルボン酸の *protocatechuic acid*, 植物ステロールの  $\beta$ -*sitosterol*, *stigmasterol*, *campesterol* また、葉からはトリテルペンの *hederagenin* などが報告されています。根皮は、民間で糖尿病、腎臓病、胃潰瘍に用いられ、棘の部分は高血圧症によいそうです。



## コーヒーの香りが変だと思ったら ニコチン酸を飲みなさい

東京薬科大学名誉教授 岡 希太郎

Key Words: COVID-19, 味と匂い, 嗅覚・味覚障害, 感染の早期症状

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に感染したかも知れないと思ったとき、どうしたら良いのでしょうか？ PCR 検査や抗体検査など、検査を受けること以外に、やることはないのでしょうか？

### ●嗅覚・味覚障害は COVID-19（感染者）の最大 90% で確認される<sup>1)</sup>。

感染者の 90% という高い確率で発症するとはいえ、原因は COVID-19 以外にも色々あります。それでも 9 割に異常が認められるからには、検査の簡便さから言って、利用しない手はありません。昨年、阪神タイガースの藤浪選手は、異常に気づいたことが切っ掛けで、直ぐに PCR 検査を受けて、治療に専念したそうです。その甲斐あって見事に復帰しています。「たかが匂いなんかで」と軽く見ずに、日に 1 度は意識的に匂いに気配りしては如何でしょうか？

自分で気づいて「嗅覚障害かも知れない」と感じて、検査を受けたいと申し出ても、それだけでは公的機関の PCR 検査や自己隔離の対象にはなりません。ですから異常を持ったまま普段と同じ行動習慣で生活するしかありません。もし本当に感染していれば、更なる感染拡大につながってしまう恐れが大きいと指摘されています。簡単に受けられる嗅覚テストがあって、それで陽性となれば、自ら自粛して感染拡大を減らせる可能性があるのです。そして我慢の自粛中に、倦怠感、発熱、咳などが出てくれば、次なる行動も決まってくるということです。

### ●嗅覚・味覚検査でコロナウイルス感染を発見する具体的方法を書いた論文がある<sup>2)</sup>。

病院の日常臨床で行われている嗅覚テストは、手順や基準がきちんと定められているので、薬局やコーヒー店で行うには難があります。かといって嗅覚異常は本人が気づかないうちに進行している場合があるので、かかりつけ医や薬局、町のコーヒー店などに、テスト用の簡便な道具があれば客観的に判定可能と思われると思います。この論文には、そういう具体的なやり方が載っています。焙煎コーヒー豆とメントール結晶の匂いを嗅ぎ分ける検査です（図 1）。

焙煎コーヒーとメントールの匂いは全く違います。しかし、もし嗅覚異常となれば、異常の種類によって、これら 2 つのどちらかを感じられないとか、2 つを区別できないとか、どちらの匂いも分からないとか、様々な症状が現れます。ですからこの 2 つの検査用試料を用意して、被験者に別々に嗅いでもらって、それぞれ

が何の匂いであるかを当ててもらうテストは嗅覚生理を判定する深い意味があるのです。2つの試料の作り方を図2で示します。

ざっとこんな具合にしてテスト用の試料を用意して、「嗅覚テストを受けてみたい」という人が居たら、是非ともお試し下さい。例え「異常なし」と出ても、それで100%安心というわけではありませんが、取りあえず一安心といった所でしょう。もし「異常あり」と出たら、PCR検査を受ける準備をしますが、それよりもっと大切なことは、「もし本当に感染していたら…」と後で後悔しないように、ナイアシンの服用を始めることです。

### ●罹ったかなと思ったらナイアシン(ニコチン酸)を飲みなさい。

新型コロナに感染すると、味覚・嗅覚の喪失、咳、発熱が三大徴候で、更にはだるさ、倦怠

感があるとのこと。昨年3月、中伊英の共同研究で、感染しても重症化を防ぐためにVB<sub>3</sub>の服用が提案されました。「咳が出始めて感染が疑われたら直ちにVB<sub>3</sub>服用が望ましい」とのことです<sup>3)</sup>。

図3をご覧ください。この論文の影響が世界のあちこちで直ぐに現れました。その訳は、感染が判明したら直ぐにビタミンB<sub>3</sub>を投与するように具体的に書かれているからです。他の治療は症状が出てから始まるのに対して、VB<sub>3</sub>(高齢者と持病もちの人はニコチン酸が好ましい)は、「感染が疑われた時点から始めよう」というのです。

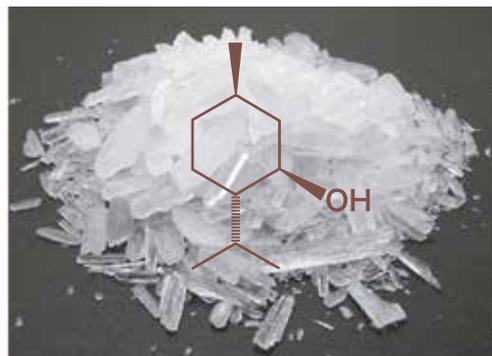
まず香港にある大病院OT&Pクリニックはそのホームページに、一般向けの解りやすいブログを掲載して解説しています<sup>4)</sup>。米国のMcWヘルスケア社は「咳が出たら迷わずナイアシン」と明記しました<sup>5)</sup>。「VB<sub>3</sub>は毒にならないので安心して飲みなさい」とも書いてあります。

しかし残念なことに、日本では市販のビタミン剤「ニコチン酸」が販売中止になりました。そのため、コーヒー好きの人なら、ナイアシン(ニコチン酸)が入っている深く煎ったコーヒーを飲むか、ナイアシンを配合している唯一の国産薬、ノイビタZE(第一三共)を飲むしかありません。あるいは、米国産のサプリメントをネット購入できますが、この場合は偽物に気をつけないと副作用で悩むことになりかねません<sup>6)</sup>。

しかし困ったことに、咳が出てもそれがCOVID-19なのか、それともただの風邪なのか、素人に区別は困難です。そこで筆者が選んだ方法は、藤浪選手が気づいた嗅覚異常です。

### ●コーヒーの香りが変だと気づいたら、メントールがおかしいと感じたら、直ぐにナイアシンを飲みなさい。

味の異常は自分で気づきますが、嗅覚の異常は自分では気づきにくいものだそうです。そこで簡単にで



Menthol Crystal

図1 嗅覚テストに使う焙煎コーヒーとL-メントール

#### ●コーヒーテスト試料の作り方

焙煎豆または挽いた粉の適量を、お手玉か匂い袋のようにして缶に入れ、蓋をする。テストでは、缶の蓋を開けて、嗅いでもらう。

#### ●L-メントールテスト試料の作り方

L-メントールの結晶10g程度を、お手玉か匂い袋のようにして缶に入れ、蓋をする。テストでは、缶の蓋を開けて、嗅いでもらう。

図2 嗅覚テストに使う試料の調整法

感染しても免疫が健全に働いている間は軽傷ですむ。しかし、活性化T細胞がIL-6を放出し始めると、やがてサイトカインストームが起こり、肺胞の壁がガラス状に固まってしまう。そうなるとう呼吸が苦しくなる。治療薬の中でVB<sub>3</sub>は特に重要で「咳が出たら飲む」が良い。

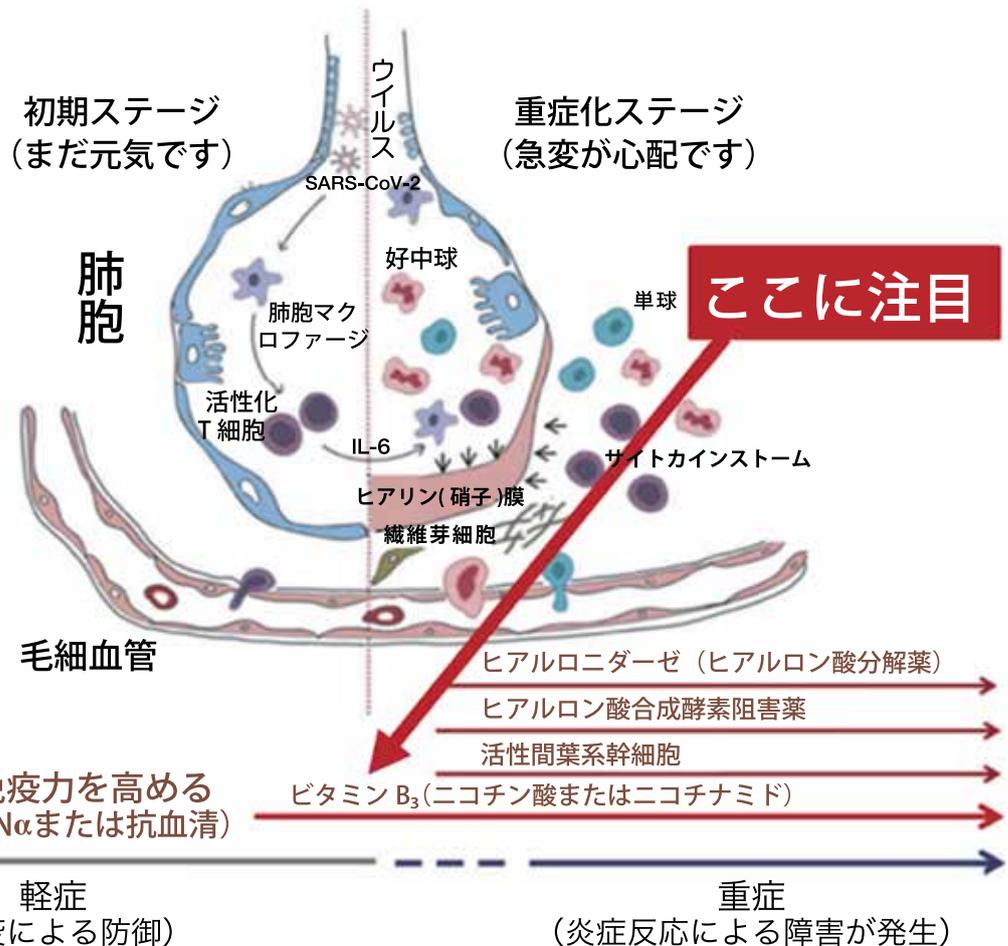


図3 COVID-19の臨床経過と有効な補助的治療

きる客観的な嗅覚テストに意味があるのです。最近では以前より簡便にPCR検査を受けることができますが、それより前に普段から「嗅覚に気を配る」生活習慣を身につけましょう。普段から行きつけのコーヒー店でも、コーヒーテストの試料が置いてあれば試してみましよう。かかりつけ医や薬局でも試料があれば非常に役立つはずです。

今、増えつつある変異型ウイルスに勝つためにも、ナイアシンを飲んで、深煎りコーヒーを飲んで、苦くて嫌だというなら「希太郎ブレンド」にして、自然免疫力を高めておくのが一番です。コーヒーは1日3～4杯ならば、飲んでも害はありません。

参考文献

1. Cousyn L, Sellem B, Palich R, et al.: Olfactory and gustatory dysfunctions in COVID-19 outpatients: A prospective cohort study. *Infect Dis Now*. March 22: 2021. Online ahead of print.
2. Bidkar V, Mishra M, Selvaraj K, et al. Testing Olfactory and Gustatory Dysfunctions among Quarantine COVID-19 Suspects. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. Oct 14: 1-6, 2020. Online ahead of print.
3. Yufang Shi, Ying Wang, Changshun Shao, et al.: COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ*. 27: 1451-1454, 2020.
4. <https://www.otandp.com/blog/covid-19-about-vitamin-b3>
5. <https://mcwhealthcare.com/study-suggests-niacin-should-be-used-as-soon-as-coughing-begins/>
6. <https://www.intechopen.com/books/dyslipidemia/the-role-of-niacin-in-the-management-of-dyslipidemia>

# 希太郎ブレンド<sup>®</sup>

## Kitaroblend — 美と若さ —

### コーヒーは「百薬の王」

希太郎ブレンド<sup>®</sup> は1杯のコーヒーに秘められたコーヒーパワーを解明し、珈琲博士：岡 希太郎氏がブレンド法特許に基づいて「クロロゲン酸」と「ニコチン酸」を多く含んだブレンドを創作し製品化しました。

銀色パッケージの浅煎り豆は、「クロロゲン酸」が多く含まれ「美（肌への紫外線をカット）」を追求しています。

茶色のパッケージの深煎り豆は、ビタミンB<sub>3</sub>「ニコチン酸」が多く含まれ「若さ」を追求しアンチエイジングが期待されます。

(改質コーヒー製造法：日本特許 4771063, 4771064) (商標番号 6252103)



### ● 創作ブレンドは2種類をご用意

浅煎り・深煎りの割合により「香り」「コク」「栄養成分」を自分好みに楽しむことができます。

美を追求したいという方には・・・

爽やかな香りと酸味が楽しめる「浅煎り6：深煎り4」がオススメです。

若さを追求したいという方には・・・

深いコクと香りが楽しめる「浅煎り3：深煎り7」がオススメです。

希太郎ブレンド<sup>®</sup> はフレイルにも配慮したブレンドです。

### ● 美味しいコーヒーの淹れ方

二人分：20g 程度の豆を中挽きし、セットしたフィルターに挽いたコーヒーを入れ、コーヒーを蒸らすために少量の熱湯 (30cc 程度) を中心から外側に静かにドリッパーに注ぎ、20~30 秒ほどコーヒーを蒸らします。その後、熱湯を粉の中心から外側へゆっくりと「のの字」を書くように注ぎ、外側まで行ったあと今度は中心に向けて静かに戻ります。細かな泡 (コーヒーの灰汁) が立ち上がり、その泡がドリッパーに残るようにすると円やかでコクのあるコーヒーが抽出されます。

お申し込みは下記サイトから

<https://iyakukeizai.com/page/kitaroblendproduct>

【販売元】 プルミエ 〒275-0026 千葉県習志野谷津 5-4-7 ファースト谷津ハイツ 1-101





素を題材にした研究ができるだろう、と期待して筆者の研究室へ入ってきたようだった。ところが、微生物生理学の実験ばかりを繰り返しているうちに、自分の希望はいつまで経っても叶えられないのではないか、と考えるようになったらしい。

多少の思案の後に筆者から提案したのは、エリスリトール (erythritol) という糖アルコールから水素を奪う形で酸化するデヒドロゲナーゼの存在を、*L. starkeyi* で検索するという内容だった。糖アルコールとは、糖 (一般式:  $C_nH_{2n}O_n$ ) がもう一段階還元された (水素が付加された) 化学構造 (一般式:  $C_nH_{2n+2}O_n$ ) をしている。炭素数4個 ( $n=4$ ) の糖アルコールであるエリスリトールは、酵母分類学で資化性試験をする炭素源のひとつである。これを資化できる酵母は限定されており、*L. starkeyi* は資化が可能な酵母のひとつだった。

## 1-2. エリスリトールデヒドロゲナーゼの存在を予感

*L. starkeyi* はエリスリトールを唯一の炭素源にして増殖できるのだから、それを外部環境から細胞内部へ取り込んだ後に、通常の代謝生産物へ変換する酵素を持っているに違いない。エリスリトールの化学構造に最も近い通常の代謝生産物は、エリト (ス) ロース 4-リン酸である。それは糖代謝の主流を成すヘキソースリン酸経路から見ると、傍流となっているペントースリン酸回路に存在する。

ヘキソースリン酸経路とは解糖系のことであり、ヘキソ (hexo-) は6、オース (-ose) は糖を表わす語尾であるから、六炭糖 (グルコースやフルクトース) がリン酸化 (リン酸と結合) された状態で代謝が進むことを表わしている。ペントースのペント (pento-) は5をあらわしているから、ペントースリン酸回路は五炭糖 (炭素原子5個が連結した糖で、リボース、キシロース、アラビノースなどの総称) がリン酸化された代謝の道筋を表わしており、生体が必要とする五炭糖と  $NADPH + H^+$  を供給する経路として重要である。

ペントースリン酸回路は、結果だけで見れば、6個のリン酸化された五炭糖から5個のリン酸化された六炭糖を作る回路である。その回路反応で出発物質になるリン酸化された五炭糖は、ヘキソースリン酸経路のグルコース 6-リン酸から脱炭酸して作られ、その脱炭酸にいたる途中で  $NADPH + H^+$  を

2回にわたって供給している。

ペントースリン酸回路を理解しようとする、三炭糖、四炭糖、五炭糖、七炭糖のリン酸化合物が途中にあり、それらを変換する反応を触媒するトランスアルドラーゼとトランスケトラーゼが関与している。このように化学構造が複雑に変化する幾つかの反応の中にあるのがエリト (ス) ロース 4-リン酸である。したがって、*L. starkeyi* がエリスリトールを資化する経路の第一段階は、脱水素 (酸化) する酵素であり、生成物はエリト (ス) ロースではないか、と推定した。

## 1-3. エリスリトールの資化を容易に発現させる

エリスリトールを唯一の炭素源にした培養を始めたが、なかなか増殖が見られないという。それは当然のことであり、平素は六炭糖を炭素源にして生育していた酵母細胞が、四炭糖という奇妙な炭素源を与えられると戸惑うだろう。はじめはそれを細胞内へ取り込む機構が準備できていないし、取り込んでも代謝する経路を開拓するのに時間が掛かるものだ、と適応現象の表われ方を説明した。

約半月を経て、細胞増殖が観察できるようになった。増殖してきた細胞を種菌にして新しいエリスリトール培地へ植えつくと、数日後には増殖が観察できた。さらに新たなエリスリトール培地へ植え継ぐと、翌日には細胞増殖を確認できた。その細胞を、エリスリトールを炭素源にした寒天培地へ植え継ぎ、それ以後の実験に使う種菌とした。

## 1-4. エリスリトールデヒドロゲナーゼ活性が検出できた

エリスリトール培地で培養した細胞から無細胞抽出液を取り出すには、Mix Tower A-14を用いた。デヒドロゲナーゼ活性の補酵素には  $NAD^+$ 、 $NADP^+$ 、 $FAD$ 、 $FMN$  等を使ったところ、 $NAD^+$  が補酵素であると直ぐにわかった。デヒドロゲナーゼの補酵素になる  $NAD^+$  あるいは  $NADP^+$  は波長 340 nm の光を吸収しないが、その還元型である  $NADH$  あるいは  $NADPH$  は 340 nm に吸収極大を持つ性質があるので、反応が進めばその波長の光の増減で比較的簡単に確認できる。

## 2. エリスリトールデヒドロゲナーゼ (EDH) が推進する反応

エリスリトールデヒドロゲナーゼ (erythritol dehydrogenase: 以後 EDH と略記する) が関わる酵素反応の生成物が、アルドースのエリスロース (= エリトロース: erythrose) であるか、ケトースのエリスルロース (= エリトルロース: erythrulose) であるかを調べる目的で、逆反応を行わせてみた。なお、アルドースとは末端の炭素がアルデヒド基の糖であり、ケトースとは末端から2番目の炭素がケトンになった糖である (図1)。

エリスロースを基質 (酵素反応で作用を受ける物質) にしても EDH の逆反応は進行しなかったが、エリスルロースを基質にすると逆反応が進行した。

したがって、エリスリトール資化にかかわる第一段階は NAD<sup>+</sup> が補酵素になる EDH であり、その反応生成物はエリスルロースであると、ひとまず判断できた。この段階で、実験前に筆者が推定した、EDH による反応生成物がエリスロースではないかという推定は間違いだったことがわかった。

### 2-1. EDH を部分精製する

EDH の逆反応の結果だけから反応生成物の化学構造を決定するのでは不十分である。反応生成物の化学構造を確かなものとして決定するには、反応生成物を精製し、化学構造を解析しなければならない。

その解析に先立って、反応触媒となる EDH を無細胞抽出液から部分精製 (下掲の [注] を参照) した。無細胞抽出液へ水温下で硫酸 (硫酸アンモニウム) を徐々に溶解させ、その濃度を高めてゆく。硫酸は水分子ときわめて親和性が高いので、溶解していたタンパク質分子の周辺にある水が奪われてしまい、水との親和性が低いタンパク質であるほど溶解して

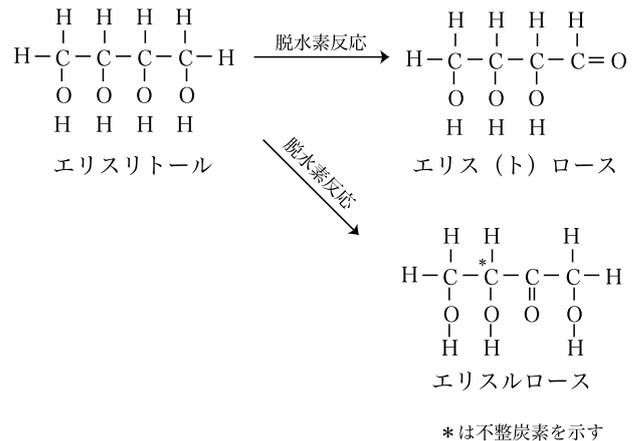


図1 エリスリトール, エリスロース, エリスルロースの化学構造

いられなくなり、沈殿 (塩析) がはじまる。硫酸の飽和溶液を硫酸飽和度 100% とし、飽和度が何%で沈殿するかという方法でタンパク質を分画するのを硫酸分画法と呼んでいる。その硫酸分画法を用いて、EDH 活性を持つタンパク質が塩析沈殿してくる画分を得る部分精製をした。

### 2-2. EDH が関わる反応生成物の化学構造

無細胞抽出液から部分精製した酵素を用いて EDH 反応を 25°C で 6 時間行い、反応液を限外濾過 (一定の大きさを超える分子を通過させない多孔性の人工膜を用いる濾過) してタンパク質を除去した。タンパク質を除去した液体部分を、Amide-80 カラムを用いたクロマトグラフィーで生成物を純粋に分離 (単離) した。

生成物を質量分析, <sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルで解析をしたところ、カルボニル基 (>C=O) を含み、そこへ隣接した -CH<sub>2</sub>OH と >CHOH とが存在する、と分かった。比較する標準物質として使った試薬のエリスルロースも同じ結果

[注: 生化学では、多種類のタンパク質の混合物 (例えば無細胞抽出液) から、目的とはしていないタンパク質を除外し、目的とするタンパク質の比率を大きくする操作を精製といっている。精製 (purification) といっても “純粋な目的タンパク質だけにする” とは限らない。機能の解析をしたいとするタンパク質の邪魔にならない程度にまで、不要なタンパク質を排除する操作を部分精製 (partial purification) と表現している。無細胞抽出液のような粗抽出液から目的以外のタンパク質を排除してゆくと、タンパク質 1mg あたりの目的とした酵素の活性値が高くなるから、部分精製がどの程度進んだか理解できる。この相対値を比活性 (specific activity) とよんでおり、無細胞抽出液の段階のタンパク質 1mg 当りで検出される活性を 1 としたときに、比活性が 10 になったとすれば、10 倍に精製した、と表現する。なお、純粋な 1 種類のタンパク質を、まとまった量として得る (例えば後述する試薬として販売、使用する) には、幾種類もある精製操作を何段階も重ねなければならないのが通例である。]

を与えた。これらのスペクトル解析により、EDHの反応生成物はエリスルコースと断定できた。

EDHに関する研究論文はまだ世界の何処からも出版されていなかった。自分達が初めて成し遂げた研究成果に確信をもって発表する最後の詰めとして、旋光度の測定を行うことにした。図1に示したエリスルコースの右から3番目の炭素は不整合炭素であるから、D体であるかL体であるかを、旋光計を使って区別しておく必要があった。この区別を行うには反応生成物を多めに得なければならぬので、1970年代に発達したリサイクル反応を利用した。

乳酸デヒドロゲナーゼ（乳酸：lactic acidを脱水素してピルビン酸に酸化する反応とその逆反応を触媒する酵素であり、逆反応の方を強く推進する）は $\text{NAD}^+$ を補酵素にし、精製酵素が市販されている。ひとつの反応系にピルビン酸とエリスリトール、およびEDHと乳酸デヒドロゲナーゼを入れておく。さらに $\text{NAD}^+$ を僅かに加えれば、EDHで生成された $\text{NADH} + \text{H}^+$ はピルビン酸を乳酸へ還元する反応に使われるから、 $\text{NAD}^+$ は $\text{NADH} + \text{H}^+$ との間を往復しながらエリスルコースと乳酸を生産してゆくりサイクル反応が成立する。反応の終了後に、酸である乳酸とピルビン酸をイオン交換樹脂で除去し、最終的にはエリスルコースが約0.5g得られた。これを水溶液にして旋光計で測定したところ、L体であることが明らかになった（Nishimuraら *J.Biosci. Biotech.*, **101**: 303~308 2006）。

### 2-3. 精製したEDHから遺伝子解析へ

上記した硫安沈殿で部分精製した酵素を、数段階

におよぶカラムクロマトグラフィーと電気泳動で純粋なEDHに精製した。そのEDHタンパク質のN末端側から24個のアミノ酸配列を解析した。この解析結果からDNAの塩基配列順序を推定し、全DNAからEDHの構造を情報化している部分を取り出そうとした。

相当な努力をしたにもかかわらず、残念ながら、その試みは失敗に帰した。分子生物学の門前まで進みながら、門から内側を覗こうとしただけで終わってしまった。

教育・研究職で定年退職が1~2年後に迫ると、在職中に是非してほしい、という諸々の依頼が職場の内外から殺到した。次々と上積みされるお話の幾つかは止むを得ずお断りしながらも、博士論文の審査と学会関係の依頼だけは何とかしよう、と時間のヤリクリに無理を重ねていた。

異様に肩がこり、けだるい幾日かが続いた後に、健康体の時には陰を潜めていた常在性ウイルスが体内で大増殖をしてしまった。41度に達する高熱と、定期的に襲う身体の激しい震えに耐えられなくなり、救急車で入院した。診断書には敗血症と書かれ、3日間は集中治療室で点滴を受けて過ごし、それに続いて約2週間も入院した。その入院中のベッドの上でも、預かった博士論文原稿へ赤ペンで修正を加えなければ審査日程に間に合わない、という状態だった。

そうした超多忙な日を送ると、神経がササクレ立って怒りっぽくなり、学生への研究指導に丁寧さがなくなってしまった。在職最後の1,2年に卒業論文研究学生として在室した学生には、すまないことをした、という思いでいる。

## 安定した環境でカリフォルニア プレミアムプルーンは見通し良好

カリフォルニア州ローズビル -2021年6月9日- この春、カリフォルニアのプルーン農園では白い花が満開に咲き誇り、やがて新たな果実が実るに従って色彩を変え、美しいショーのような光景が展開しました。サンホアキン・バレー及びサクラメント・バレーのプルーン生産者からは、良好で広範かつ質の高い開花の様子が報告されました。

2021年は7万5千トンの収穫が見込まれており、カリフォルニアプルーンのプロデューサーは、樹木や土壌の健康維持、夏の収穫に向けた人員の確保など、カリフォルニア特産品である高品質プルーンのプロデュース準備を着々と進めています。パンデミックの最中、カリフォルニアプルーンに対する需要が加速しましたが、業界はスマート在庫管理によってお客様への安定した供給を確保しています。

「安定した天候と着実な供給体制により、カリフォルニアプルーン業界は好調を維持しています」と、カリフォルニアプルーン協会会長のドン・ズイーは述べています。「ここ一番という時にお客様に高品質で健全な商品を提供するために毎年カリフォルニアで確保している繰り越し在庫のおかげもあって、作付けと供給が均衡しています。」

世界最大のプルーン供給地として、カリフォルニア州は全米をはじめ主な輸出市場での需要を満たすべくさまざまなプレミアムサイズのプルーンを提供しています。世代を超えた熟練の技や精巧な空調設備を備えた乾燥トンネルのほか、農園管理業務のさらなる向上や健康にもたらすメリットをより深く理解するための研究活動への投資により、カリフォルニアのプルーン生産者や流通業者は盤石な基盤を確保しています。

「毎年の安定した供給の確保に向け、業界全体で取り組んでいます」とズイー会長は言います。「100年を超えるプルーン栽培の経験を通じてさまざまな困難の克服方法を編み出してきました。それでも、一瞬たりとも気を抜いたことはありません。」



カリフォルニアプルーン



カリフォルニアプルーン農園

カリフォルニア州の農業規格は全米でも最高水準を誇ります。プルーン生産者や流通業者は、効率性を損なうことなく採算性や持続可能な食品システムの構築を支援するために多大な投資を行っています。カリフォルニアのプルーン業界は毎年、年間7億1,700万ドル以上の経済効果を州経済にもたらし、7千件を超えるフルタイム相当の仕事を生み出しています。

### ■カリフォルニアプルーン協会について

カリフォルニアプルーン協会は1952年に設立され、広告宣伝、PR、広報、栄養調査、作柄管理、持続可能性調査、危機管理などの活動を通じて、カリ

フォルニアプルーンの市場における高い地位の確立、消費者への浸透を目指しています。カリフォルニアプルーン協会は、カリフォルニア産プルーンのおよそ 800 の生産者及び 28 の加工業者を代表する機関で、カリフォルニア州農務局の管轄のもとに活動を行っています。

■本件に関する問い合わせ：カリフォルニアプルーン協会 日本事務所

担当：本田，由田，坂本 Tel：03-4540-6598 E-mail：info@prune.jp URL：https://www.prune.jp

---

## ハーバード大学研究チーム，最新テクノロジーによる くるみの健康効果を発表「くるみを摂取した後の代謝物が 2 型糖尿病や心血管疾患のリスク軽減に関係することが明らかに」

---

カリフォルニア州フォルソム（2021 年 2 月 2 日）—ハーバード大学 T.H. チャン公衆衛生大学院の研究チームが AI の機械学習を利用して、アメリカ人の死因上位にランクインする 2 型糖尿病や心血管疾患のリスク軽減につながる可能性のある、くるみの成分特定に成功しました。

『Journal of Nutrition』誌に掲載された論文<sup>1)</sup>によると、研究では機会学習の新しいアプローチ法（agnostic machine-learning）を用いて、くるみを摂取した際に生成される 19 の代謝物が同定されました。代謝によって生成・消費される代謝物は、身体が摂取した食べ物に応じて生成されます。本研究では、くるみを摂取した際の代謝物には、2 型糖尿病では 17%，心血管疾患では 29% のリスク軽減への関与が明らかになりました。

くるみの代謝物と心血管代謝疾患リスクとの関連を検証したのは今回の研究が初めてであり、本研究を支援しているカリフォルニアくるみ協会は、「くるみと心疾患に関する 30 年にわたる研究がまた一歩大きく前進した」とコメントしています。

心筋梗塞や心不全などの心疾患と脳卒中などの脳血管疾患を合わせた心血管疾患は、世界の死因の 1 位であり<sup>2)</sup>、日本においてもがんに続き死因の第 2 位となっています<sup>3)</sup>。糖尿病がある人では、糖尿病でない人に比べて心血管疾患の発症リスクや血管疾患により死亡するリスクが高まることが、さまざまな疫学研究から明らかとなっています<sup>4,5)</sup>。

ハーバード大学 T.H. チャン公衆衛生大学院栄養学の科学的研究員であり、本研究の主任研究員であるマルタ・グアッシュ＝フェレ博士は、本研究結果を受け、次のように述べています。「最新テクノロジーを活用した本研究では、くるみには特異的な代謝学的特徴があることが明らかになりました。これは、くるみがどのように健康に良いのかを知る上での大きなステップとなります。また、今回利用したような最新テクノロジーは、今後の栄養摂取についてのアドバイスのあり方を作っていくと言えます。データ駆動型のテクノロジーによって、食生活と疾病の関連についての理解が深まり、栄養に関する個別化アプローチも可能になりました。これは、さまざまな健康問題の予防や管理に役立っています。」

この研究では、PREvencion con DIeta MEDiterranea（PREDIMED，地中海食による疾患予防）と呼ばれる試



験の被験者1,833人のデータを精査しました。PREDIMEDとは、心血管疾患の高リスクグループを対象とする、地中海式食生活と心血管疾患予防との関連を複数年にわたって調べたスペインの大規模調査です。この試験では、55～80歳の対象者を(1)ミックスマッツ(くるみ50%、アーモンド25%、ヘーゼルナッツ25%)を加えた地中海食、(2)エキストラバージンオリーブオイルを加えた地中海食、(3)低脂肪食をそれぞれ摂取する3つのグループに分け、経過を観察しています。

その結果、くるみの代謝物が2型糖尿病や心血管疾患発症の抑制に関与することが明らかとなりました。これにより、くるみを取り入れた健康的な食生活と良好な心血管代謝との関連が改めて確認されました。今回の疫学研究のように、新規テクノロジーを利用することで、今後も食生活と疾病の関連が明らかになっていくと期待されます。ただし本研究では、対象者がスペインの高齢者に限定されていることから、他のグループを対象として検証を重ねる必要があり、因果関係を十分に証明する必要があります。また、代謝学が急速に発達している点を考慮すると、今回特定された以外のくるみ摂取のバイオマーカーやくるみを摂取した後の個々人の代謝反応を確認する研究も必要と思われます。

今回の研究について、日本生活習慣病予防協会理事長の宮崎 滋先生は、くるみ摂取が2型糖尿病や心血管疾患の予防に寄与する可能性を示すものであり、注目すべきとして、次のように評価しています。「この研究では、PREDIMED試験のデータを元に、新しいアプローチ法によりくるみを摂取した際の代謝物と2型糖尿病、心血管疾患リスクとの関係が検証されています。スペインで行われた同試験は、健康に良いとされる地中海食をとっている人の中で、くるみなど堅果類摂取群と、オリーブ油を摂取した群、および低脂肪食を摂取した群で心血管疾患の予防効果を比較したものです。

地中海食や低脂肪食は、もともと2型糖尿病や心血管疾患を予防する食事とされており、その中でもくるみ等堅果類を多く食べることで予防効果が高まるのは注目すべきです。

日本人はくるみなど堅果類を多く食べる食習慣があまりないので、今後はくるみの摂取を日常の食事に取り入れることをおすすめします。ただこの研究は、くるみの摂食による代謝物の類似性を見たものであり、スペインの高齢者を対象とする研究なため、実際の因果関係を前向き研究で確かめる必要がありますが、くるみを摂取すると2型糖尿病や心血管疾患の予防に有用であることを示唆するものと言えます。」

## 参考文献

1. Guasch-Ferre M, Hernandez-Alonso P, Drouin-Chartier JP, et al. Walnut Consumption, Plasma Metabolomics, and Risk of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease [published online ahead of print, 2020 Dec 31]. *J Nutr*. 2020; nxaa374. doi:10.1093/jn/nxaa374
2. World Health Organization. Cardiovascular Diseases: Fact Sheet [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1)
3. 厚生労働省『令和元年(2019)人口動態統計』<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei19/index.html>
4. Tominaga M, et al. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular diseases, but not impaired fasting glucose. *The Funagata Study. Diabetes Care* 1999; **22**: 920-924
5. The DECODE Study Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2001; **161**: 397-404.

## 【カリフォルニア くるみ協会について】

カリフォルニア くるみ協会 California Walnut Commission (CWC) は、カリフォルニア州のくるみ生産者と加工・販売業者を代表する機関で、カリフォルニア州農務局の管轄のもとに各種調査・研究、輸出相手国での啓蒙活動を行う非営利団体です。対日活動は1986年の殻付きくるみの輸入解禁と同時に設立され、その主な役割は日本におけるカリフォルニア産くるみの需要拡大を目的とする宣伝、PR、販売促進、調査などを

企画実施することにあります。海外では日本のほか、ドイツ、スペイン、UAE、韓国、インド、トルコ、イギリス、EUに代表事務所を置き、良質なカリフォルニア産くるみを広めるためのさまざまなマーケティング活動が行われています。カリフォルニアくるみ協会のホームページでは毎日の食生活にくるみを手軽に取り入れていただける健康的なレシピをはじめ、栄養と健康の情報を紹介しています。

【カリフォルニアくるみ協会ホームページ】日本語：<https://www.californiakurumi.jp/>、英語：<https://walnuts.org/>

【本件に関する問い合わせ】

カリフォルニアくるみ協会 日本代表事務所 担当：深澤・山城・高畠

TEL：03-3221-6488 FAX：03-3221-5960 E-mail：contact@kurumi-jp.org

URL：<https://www.californiakurumi.jp>

## yet2, 小林製薬株式会社のオープンイノベーション公募開始

### — 葉の有効成分抽出・分離技術を募集 —

yet2.com, Inc( 本社：米国マサチューセッツ州ボストン近郊／日本法人：株式会社イェットツー・コム・アジア 東京都千代田区、代表取締役社長：藤井 秀行、以下 yet2) は、ユニリーバ社、ペプシコ社、サントリー食品インターナショナル社他、様々な多国籍企業のオープンイノベーションに特化したポータルサイト運営業務を受託しております。このたび、yet2 は小林製薬株式会社( 本社：大阪市、代表取締役社長：小林 章浩、以下 小林製薬) に提供している同サービスより、『葉から有効成分を抽出または分離する技術』を幅広く募集いたします。募集締切日は2021年8月31日です。



OPEN INNOVATION SUBMISSION PORTAL

### 葉から有効成分を抽出または分離する技術

Request Number 135605 | Author Kobayashi

本ニーズに関するお問合せ  
株式会社イェットツー・コム・アジア (小林製薬ポータルサイト担当)  
Tel: 03-5217-0217  
Email: kobayashi@yet2.com

締め切り日: 2021/8/31

背景:

社仲茶は健康茶として一躍に広く認知されており、特定保健用食品(トクホ)や機能性表示食品としても販売されています。弊社は茶葉の加工段階で有効成分を高含有化する独自製法を開発し、様々な製品ラインナップを展開しています。しかしながら現在用いている抽出技術は熱水を基本としたもので、工夫の余地があまり残されておりません。そこで特定の有効成分の高含有化や選択的抽出により製品開発の自由度を高めるため、様々な食品分野で用いられている特徴的な抽出技術を求めることになりました。

提案書の作成

提案テンプレートに沿って入力してください

作成を開始する

## 小林製薬イノベーションポータル

### ■技術募集の背景

小林製薬では茶葉の加工段階で有効成分を高含有化する独自製法を開発し、様々な製品ラインナップを展開しています。しかしながら現在用いている抽出技術は熱水を基本としたもので、工夫の余地があまり残されておられません。そこで特定の有効成分の高含有化や選択的抽出により製品開発の自由度を高めるため、様々な食品分野で用いられている特徴的な抽出技術を求めることにしました。

### ■求める抽出・分離技術

- ・葉から有効成分を抽出または分離できる
- ・食品用途に適用できる
  - 食品用途での使用が認められていない有機溶媒を使用しない
  - HACCP 対応の製造ラインを有していると望ましい
- ・品質を定量的に管理できる
  - HPLC などで確認できる
- ・技術的に確立している
  - 現時点で当社原料(茶葉あるいはエキス末)での試験が可能である
- ・経済性に優れている

特に下記のような技術に期待していますが、その限りではありません。

- ・熱水抽出と組み合わせ可能な親水性成分の選択的抽出技術
- ・食品用途で実績のある軟エキス/エキス粉末の量産化技術

有望なご提案に対しては以下の機会をご提供いたします。

- ・製品またはプロセスの販売
- ・ライセンスング

本公募技術の詳細は下記の小林製薬のオープンイノベーションポータルサイトよりご覧いただき、該当する抽出・分離技術をお持ちの方は同ページの『提案書の作成』リンクからご提案ください。

### <葉から有効成分を抽出または分離する技術>

<https://kobayashi.yet2.com/res/innovation-portal/need.jsf?needID=135605>

募集締切日：2021年8月31日

### ■お客様からのお問い合わせ先：株式会社イェットツー・コム・アジア

小林製薬ポータルサイト 担当 email：kobayashi@yet2.com

URL：https://www.yet2.com/jp/

### ■報道関係者向けのお問い合わせ先：小林製薬株式会社 中央研究所 研究推進部 社外連携グループ

担当：渡邊 愛 email：ai-watanabe@kobayashi.co.jp

## 神奈川歯科大学，低脂肪摂取時に フラクトオリゴ糖の効果が発揮されることを発見 ～ 唾液中 IgA レベルが高値に ～

神奈川歯科大学病理・組織形態学講座 環境病理学分野 槻木 恵一教授，神奈川歯科大学短期大学部 歯科衛生学科 山本 裕子准教授らの研究グループは，先行研究で判明している唾液中 Immunoglobulin A (IgA) \*<sup>1</sup> レベルを上昇させるというフラクトオリゴ糖\*<sup>2</sup> の効果が，高脂肪摂取時には現れず，低脂肪摂取時に発現することを初めて明らかにしました。これにより，唾液中 IgA レベル上昇には，フラクトオリゴ糖摂取により大腸で産生された短鎖脂肪酸だけでなく，食事の脂肪量が影響していることが判明しました。さらに低脂肪・フラクトオリゴ糖摂取時に，カテコールアミン，ドーパミンおよびノルエピネフリンの合成における律速酵素で，交感神経活性化のマーカであるチロシンヒドロキシラーゼ\*<sup>3</sup> 濃度が，顎下腺で上昇することを見出しました。唾液中 IgA は，口腔という粘膜免疫の最前線で上気道感染症予防に重要な役割を果たしています。易感染性である高齢者や基礎疾患を有する者が上気道感染症由来の肺炎を予防するにあたって，フラクトオリゴ糖のような難消化性糖類\*<sup>4</sup> を摂取するだけでなく，1965 年頃の日本の低脂肪メニュー摂取を心がけることによる，唾液中 IgA レベル上昇の効果が期待されます。

本研究成果は 2021 年 4 月 10 日に「Nutrients」に掲載されました。

英文タイトル：Effect of High Fat and Fructo-Oligosaccharide Consumption on Immunoglobulin A in Saliva and Salivary Glands in Rats

### 【研究の背景】

IgA は粘膜免疫の主役であり，呼吸器・消化管の粘膜表面で感染防御機能を担っています。「呼吸器と消化管の入り口」として重要な役割を果たす口腔の唾液中には多種の抗菌物質が含まれていますが，中でも IgA が最も主要な抗菌物質で，唾液中 IgA が上気道感染症の感染防止に大きく関与していることは数多く報告されています。超高齢社会の日本では上気道感染症から引き起こされる高齢者の肺炎の増加が社会問題となっており，早急な予防対策が求められています。唾液中 IgA レベルを食事要因で上昇させることができれば，易感染性である高齢者や基礎疾患を有する者の肺炎予防に簡便で効果的と考えられますが，食事内容が唾液中 IgA レベルに与える効果は未だ十分に判明していません。特に免疫機能を低下させることが報告されている高脂肪食摂取が唾液中 IgA レベルに与える影響は明らかにされていません。

### 【これまでの研究の経緯】

本研究グループでは大腸で IgA 産生を増加させる難消化性糖類に注目し，ラットに 4 週間フラクトオリゴ糖を摂取させると盲腸内容物中 IgA 濃度だけでなく唾液中 IgA 分泌速度も上昇すること，フラクトオリゴ糖摂取時に盲腸で産生が上昇する短鎖脂肪酸\*<sup>5</sup> が唾液中 IgA 分泌速度上昇に影響していることを明らかにしました。またポリデキストロース\*<sup>6</sup> 摂取により大腸で産生が増加し，血中に吸収された短鎖脂肪酸が唾液中 IgA 分泌速度に影響を与えていることを見出しました。これら一連の研究により，腸管が唾液腺に影響を与えている「腸-唾液腺相関」という新しいメカニズムを発見しました。しかし唾液中 IgA レベルを低下させる要因は明らかになっていませんでした。

### 【研究の成果と意義】

本研究では，ラットを用いた動物実験により，脂肪摂取量の違いとフラクトオリゴ糖摂取の有無が唾液中 IgA 分泌速度に与える影響を検討しました。ヒト栄養指導への応用を想定して，高脂肪飼料は脂肪含有量をカロリー比 40%（現在のヒトにおける高脂肪摂取上限），低脂肪飼料は脂肪含有量をカロリー比 14%（1965

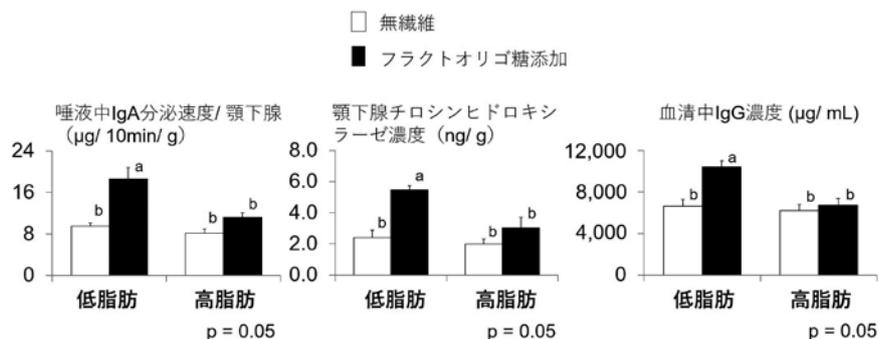


図 1

	唾液中IgA分泌速度/顎下腺 (µg/10min/g)			脂肪摂取量/日 (g)	
	r	p		r	p
顎下腺チロシンヒドロキシラーゼ濃度 (ng/g)	0.61	0.0003	血清中IgG濃度 (µg/ml)	-0.47	0.008
血清中IgG濃度 (µg/ml)	0.54	0.002	顎下腺チロシンヒドロキシラーゼ濃度 (ng/g)	-0.41	0.02

n = 32



図 2

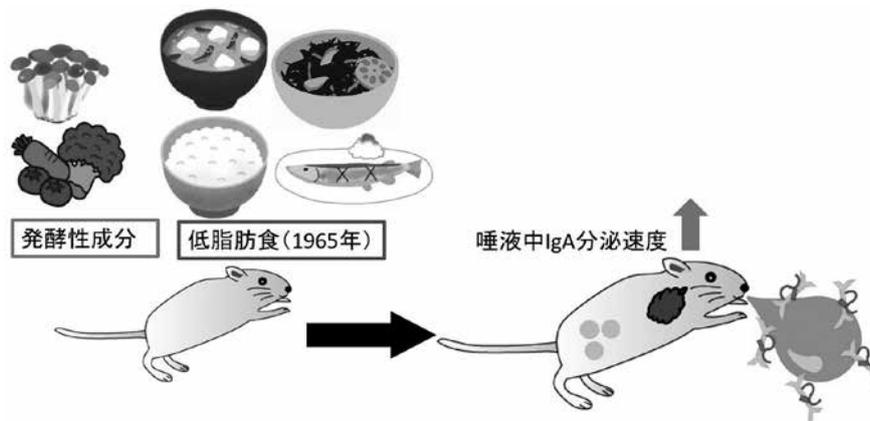


図 3

年の脂肪摂取量) に設定しました。ラットを「低脂肪・無繊維飼料摂取」, 「低脂肪・フラクトオリゴ糖添加飼料摂取」, 「高脂肪・無繊維飼料摂取」, 「高脂肪・フラクトオリゴ糖添加飼料摂取」の4群に分け、肥満の影響を排除するため各群の摂取熱量を等しくなるように調整して飼料を摂取させました。10 週後、低脂肪・フラクトオリゴ糖添加飼料摂取群の唾液中 IgA 分泌速度、顎下腺チロシンヒドロキシラーゼ濃度 (交感神経活性化のマーカー)、血清中 IgG 濃度 (全身免疫状態の指標) が高値となりました (図 1)。唾液中 IgA 分泌速度と顎下腺チロシンヒドロキシラーゼ濃度および血清中 IgG 濃度には正の相関が認められました (図 2)。また脂肪摂取量と血清中 IgG 濃度および顎下腺チロシンヒドロキシラーゼ濃度には負の相関が認められました (図 2)。

本研究により、唾液中 IgA 分泌速度にはフラクトオリゴ糖摂取により盲腸で産生が増加した短鎖脂肪酸だけでなく、食事の脂肪量が影響していることが判明しました。脂肪摂取量が全身免疫状態や交感神経活性化に関係しており、その結果唾液中 IgA 分泌速度に影響を与えている可能性が見出されました。唾液中 IgA 分泌速度を上昇させるには、フラクトオリゴ糖のような難消化性糖類を多くし、かつ 1965 年頃の日本の低脂肪なメニューを摂取することが効果的であることが明らかになりました (図 3)。

【今後の展開】

本研究により、唾液中 IgA 分泌速度には盲腸で産生された短鎖脂肪酸だけでなく、脂肪摂取量が影響を与えていることが判明しました。易感染性である高齢者や基礎疾患を有する者に対して、「高発酵性の食品だけでなく低脂肪のメニュー摂取を心がけることが、唾液中 IgA レベルを上昇させ上気道感染症予防につながる」という食事指導を行う際のエビデンスを得ることができました。今後、難消化性糖類や脂肪だけでなく、唾液中 IgA レベルに影響を与える食品の探索と、食事要因による唾液中 IgA レベル変化のメカニズム解明を続けていく予定です。

【用語解説】

\*<sup>1</sup> Immunoglobulin A (IgA)

免疫グロブリンのクラスの一つで、分泌液の主要抗体タンパク質

\*<sup>2</sup> フラクトオリゴ糖：スクロースのフルクトース側に、フルクトースが最大3個までくっついたものの総称

\*<sup>3</sup> チロシンヒドロキシラーゼ：ノルアドレナリンとアドレナリンの前駆体であるドーパミンの前駆体

\*<sup>4</sup> 難消化性糖類：ヒトの消化酵素により消化されない糖質

\*<sup>5</sup> 短鎖脂肪酸：脂肪酸の一部で、炭素数6以下のもの。具体的には酢酸，プロピオン酸，イソ酪酸，酪酸，イソ吉草酸，吉草酸，カプロン酸，乳酸，コハク酸を指す

\*<sup>6</sup> ポリデキストロース：トウモロコシ由来のブドウ糖を主原料とし、人工甘味料ソルビットとクエン酸を加えて生成された人工の水溶性食物繊維。血糖値の上昇抑制，血中コレステロール減少，腸内環境改善といった効果が知られている。

【本件に関するお問い合わせ先】

神奈川県立大学病理・組織形態学講座 環境病理学分野 教授 槻木 恵一

TEL：046-822-8866 MAIL：tsukinoki@kdu.ac.jp

www.newfoodindustry.com

ニューフードインダストリー 第63巻 第7号

印刷 令和3年 6月20日

発行 令和3年 7月1日

発行人 渡邊 力

編集人 今西 和政

発行所 エヌエフアイ合同会社

〒185-0012 東京都国分寺市本町3-7-23-302

TEL：042-312-0836(代表)

FAX：042-312-0845

振込先：三井住友銀行 国分寺支店 普通2312814

多摩信用金庫 国分寺支店 普通3073817

ゆうちょ銀行 ○一九店 当座0324817

印刷所 株式会社メイク

定価 2,750円 [本体2,500円] (送料120円)

e-mail:newfood@newfoodindustry.com

# New Food Industry 投稿規定

1. 本誌 New Food Industry は、食品に関する原著論文、総説、ノート、解説、特集原稿、国内新製品紹介、海外レポート、随想および各種研究会会告等を掲載します。
2. 投稿原稿は、日本語または英語を標準とし、欧語は使用しないでください。

和文原著論文、総説、ノート、解説には、和文タイトル、著者名および所属機関名（所在地）、次に英文タイトル、著者名、所属機関名（所在地）をつけ、本文の前に必ず7つ以内のキーワード（英語と日本語）を加える。原著論文、総説、ノートには、400単語程度の英文 Abstract をつけます。また、総説、解説等については出来れば Graphic abstract で本文の概要を説明してください。

英文原稿には、7つ以内の英語のキーワード、末尾に、和文タイトル、著者名および所属機関名（所在地）、7つ以内の和文キーワードおよび和文要約を書き入れてください。
3. 原著論文、ノート、総説については編集委員会にて査読者を選出し査読を行います（総説は査読希望があるものについて査読をします）。また、研究解説、特集等に関しては各著者の責任において投稿いただきます。

査読される原著論文は、未発表の新規知見を含み食品科学・食品の機能性等の発展に寄与するものとし、ノートは、食品業界の発展に寄与する短報とします。総説はすでに発表されたもので新たに加筆、修正をし、食品科学の知見に基づいた機能、官能評価、開発のための価値の高い研究論文などを対象とします。また、研究論文の著者が複数の場合、その責任者（研究室長・教授）等の責任において発表し、査読希望の場合に限り査読を行います。

原稿の取扱いは、編集委員会に一任され、査読を行う原稿は、編集委員会の判断で査読者を2人以上選出し掲載可の判断がされた後、編集作業にかかります。
4. 原稿はすべて A4 ワードドキュメントに、和文は横書きで40字×35行、英文の場合は72字×35行を標準とします。
5. 論文の長さは、本誌印刷時に原著論文では8～12頁（ワード頁で10～20）以内、ノートでは4頁以内とします。
6. 和文原稿はひらがな、新仮名遣いとし、物質名や学術用語などに対して欧語を用いないこと。研究に用いた機器試薬名は一般名と商標登録名、メーカー名、所在地を記載します。
7. 本文および文献中の学名やジャーナル名はイタリック、ジャーナルの巻数はボールドとします。
8. 図・写真・表並びに説明文は、別稿で提出してください。
9. 図表の挿入希望位置は、原稿欄外に指示してください。
10. 数字はすべてアラビア数字を用い、数量の単位は SI 単位を基本とする。単位および述語の略字例は次の通り。  
km, m, cm, mm, L, mL, mL, kg, g, mg, mg, mol, mmol, mM, mM, pH, b.p., f.p., MW, V, A, N, M, Rf 等
11. 引用文献は、本文中での引用順に片括弧付きの上付き番号を付して記載します。
12. 引用文献リストは、本文の後に番号順にまとめて記載します。
13. 原稿の校正は、初校・再校まで著者が行い、大幅な修正、加筆は不可。三校以降は希望があれば行います。
14. 掲載された論文は、論文公開検索システム等に採択されます。掲載論文の著作権は、エヌエフアイ合同会社に帰属します。
15. 掲載された論文は、出版元の許可を得れば頒布、複製、著者 HP での公開をしてもよい。



# New Food Industry

エヌエフアイ合同会社

本社：〒185-0012 東京都国分寺市本町3-7-23-302  
電話 042-312-0836 FAX 042-312-0845

定価：2,750円 本体2,500円  
(送料120円)

雑誌 89591-6



4910895910611  
02500