

New Food Industry

New food indust. 63 (8): 2021.

2021
8

原著

- ◆ シイタケ菌株とヒラタケ菌株の
—20℃凍結保存における前処理時間の影響—

総説

- ◆ 高ポリアミン食の継続摂取によるアンチエイジング効果
—納豆を用いた介入試験—

コーヒー博士のワールドニュース

- ◆ 「希太郎ブレンド」が苦くないわけ

随想

- ◆ より良い特許明細書を求めて(パート2)
- ◆ ポスト・コロナ時代の国際交流の在り方について
—日本医療科学大学における関連プログラムの展望—

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

酸化防止剤

B H A
B H T
サステン乳液A
サステン乳液T

Sustane



日揮エニバーサル株式会社

化成品部/東京都品川区大崎1-6-3 日精ビル
電話(03)5436-8470 FAX(03)3493-9125

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

- シイタケ菌株とヒラタケ菌株の
-20℃凍結保存における前処理時間の影響

富樫 巖, 村上 希生, 川島 萌 555

総説

- 高ポリアミン食の継続摂取によるアンチエイジング効果
—納豆を用いた介入試験—

早田 邦康 565

母乳の力

- 生体防御機能の基礎知識

大谷 元 581

連載解説

- グルテン - 沈殿要因-3

瀬口 正晴, 吉野 精一 595

連載 コーヒー博士のワールドニュース

- 「希太郎ブレンド」が苦くないわけ

岡 希太郎 605

食品ロス対策 日持向上機能を持つビタミン

- ◆チアミンラウリル硫酸塩(ビタミンB₁)製剤
- ◆ビタミン強化や、日持ち向上用途に
- ◆真菌(カビ・酵母)、乳酸菌にも有効
食塩・エタノール・有機酸の併用で
効果増大



ビタゲン®

ビタゲン®の応用例：醤油、味噌、梅干し等



株式会社 **タイショー テクノス**

[本社] 〒103-0015 東京都中央区日本橋箱崎町36番2号
☎03-3808-1441 <https://www.taishotechnos.co.jp/>

連載 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —

- アサガオ *Ipomoea nil* (L.) Roth (=Pharbitis nil (L.) Choisy)
(ヒルガオ科 Convolvulaceae)

白瀧 義明 610

随想

- より良い特許明細書を求めて (パート2)

宮部 正明 615

- ポスト・コロナ時代の国際交流の在り方について
— 日本医療科学大学における関連プログラムの展望 —

新藤 洋子 619

News Release

- ◆ こんにやく由来セラミドのヒト脳内アミロイドβ蓄積抑制効果を検証
アルツハイマー病などによる認知機能低下の抑制に期待！ 626
- ◆ 東栄新薬がアガリクス KA21 摂取によるアッカーマンシア菌増殖の
特許を出願、肥満改善・糖尿病の治療・がん免疫療法などに有用 628

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、フクフク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

シイタケ菌株とヒラタケ菌株の −20°C凍結保存における前処理時間の影響

富樫 巖 (TOGASHI Iwao)^{*}, 村上 希生 (MURAKAMI Kio), 川島 萌 (KAWASHIMA Moe)

Key Words : 食用菌, 菌株, 菌体ディスク, 保存, 凍結

Effects of pre-treatment time at 25°C for cryopreservation of
shiitake (*Lentinula edodes*) and hiratake (*Pleurotus ostreatus*)
mushroom strains at −20°C using concentrated saccharide aqueous solutions

Authors: Iwao Togashi^{*}, Kio Murakami, Moe Kawashima

***Corresponding author:** Iwao Togashi

Affiliated institutions:

National Institute of Technology (KOSEN), Asahikawa College,
(2-2-1-6, Shunkodai, Asahikawa City, Hokkaido, 071-8142, Japan.)

Key Words: Edible mushroom; Strain; Mycelial disk; Preservation; Freezing

Abstract

The pre-treatment effects of incubation time at 25°C on the cryopreservation of shiitake and hiratake mushroom strains at −20°C using mycelium-agar discs soaked in four kinds of saccharides aqueous solutions as cryoprotectants were investigated. In comparison with samples that were not incubated before freezing, the survival rates of all eight mushroom strains (shiitake: ANCT-05072, NBRC 30877, NBRC 31107, NBRC 31864; hiratake: ANCT-15001, NBRC 8444, NBRC 30160, Po 89-1) were improved by the pre-treatment with 40% (w/w) saccharides aqueous solutions (glucose, sucrose, maltose and trehalose) for 24–72 h. In shiitake, the survival rates of the four strains until 20 weeks were nearly 100% only with the sucrose aqueous solution regardless of the pretreatment time. Conversely, the survival rate of the four strains of hiratake until 20 weeks were nearly 100% with the three disaccharide aqueous solutions—such as sucrose, maltose and trehalose—regardless of the pre-treatment time. Only in the combination of trehalose and NBRC 31864 (shiitake), a positive correlation existed in survival terms (12–20 weeks) and the pre-treatment time (24–72 h). As for the mycelial growth rates at 25°C after the cryopreservation of seven strains except NBRC 30160 (hiratake) for 20 weeks using the sucrose aqueous solution combined with the all pre-treatment time, there were no difference with the controls (subculture strains). In NBRC 30160, the mycelial growth rates of the 48–72 h pre-processing was lower than the mycelial growth ones of the control. In a further study of cryopreservation for shiitake and hiratake strains at −20°C, the performance of the combination of 40% (w/w) sucrose aqueous solution and incubation at 25°C for less than 48 h before freezing is expected.

富樫 巖 (Iwao Togashi)^{*} (責任著者) E-mail: togashi@asahikawa-nct.ac.jp

(独) 国立高専機構 旭川工業高等専門学校 (〒 071-8142 旭川市春光台 2 条 2 丁目 1-6)

はじめに

菌体ディスク法を用いる食用菌・菌株の菌糸体の凍結保存においては菌種・菌株・凍結保護液の組合せによる差異があるものの、-20℃では超低温の-85℃や液体窒素の-196℃と比べて生存率が低く、特にシイタケ (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) は死滅し易い^{1,2)}。一方、著者らは食用菌・菌株の凍結保存の低コスト化を狙い、-20℃の利用可能性を検討^{3,4)}してきた(加えて、本誌 55(1): 6-12, 2013.; 62(6): 391-398, 2020.; 63(3): 177-184, 2021.; 63(5): 360-366, 2021. 参照)。その結果、シイタケとヒラタケの菌株においてグルコースやマルトースの40% (w/w) 水溶液を凍結保護液に用いると10% (w/w) グリセリン水溶液よりも生存率の改善が見込めること、凍結前に菌体ディスクを凍結保護液(上述濃度のグルコース水溶液など)と共に25℃で24時間放置すると-20℃凍結での生存率が改善することを明らかにした。

本研究では凍結保護液にグルコース、マルトース、スクロースおよびトレハロースの計4種類の40% (w/w) 水溶液を用い、25℃で24~72時間の前処理を施したシイタケとヒラタケの各4菌株(合計8菌株)について最大20週間の-20℃凍結を行い、供試菌株の生存率変化や保存後の菌糸伸長挙動など前処理時間の影響を観察した。

1. 実験方法

1-1. 供試菌株と凍結保存方法

シイタケ菌株には ANCT-05072(旭川高専保存株)、NBRC 30877, NBRC 31107 および NBRC 31864 の4菌株、ヒラタケ菌株には ANCT-15001, NBRC 8444, NBRC 30160 および Po 89-1(林産試験場保存株)の4菌株をそれぞれ用いた。いずれも PDA 培地(日本製薬製)で継代培養保存(7℃)していたものである。凍結保存に供試する菌体ディスクの作成には、直径90mmのシャーレを使用した PDA 平板培地(シイタケ用)または MA 平板培地(ヒラタケ用: オキソイド製の麦芽エキスと寒天粉末を供試、濃度はそれぞれ2%と1.5%)を用いた。各供試菌株を接種後に、25℃で14日間培養(シイタケ)または9日間培養(ヒラタケ)したコロニーからコルクボーラーで寒天培地ごと打ち抜くことで直径5

mmの保存用菌体ディスクを得た。

シイタケ菌株の保存では1.5mLのマイクロチューブ(エッペンドルフ製)に菌体ディスク5個を入れ、凍結保護液として高圧蒸気滅菌(121℃・15分間)した約1mLの各糖類水溶液を満たした。ヒラタケの保存では1.8mLのクライオチューブ(ヌンク製)に菌体ディスク5個を入れ、凍結保護液として約1.3mLの各糖類水溶液で満たした。糖類としてはグルコース(単糖)、スクロース、マルトース、トレハロース(以上、二糖)の合計4種類を供試し、水溶液の濃度は全て40% (w/w)とした。その後、25℃で24時間、48時間および72時間放置する前処理を施して-20℃のフリーザーで最大20週間の凍結保存を行った。前処理を行わずに凍結保存する試験区を併せて設けた。なお、以上の凍結保存操作および1-2に示す生存率測定をそれぞれ2回繰り返した。

1-2. 生存率と菌糸伸長量の測定方法

経時的にサンプリングしたチューブを30℃のアルミブロックに5分間差し込んで解凍し、各チューブ内の菌体ディスク5個を1枚のPDA平板培地に接種した。25℃・10日間の培養を行い、同ディスクからの菌糸再生状況を実体顕微鏡観察した。菌糸が再生して培地に活着した時点で生存と判断し、1組5個の菌体ディスクの活着で生存率100%とした。

スクロース水溶液で20週間凍結保存後に生存率100%を示した8菌株のサンプルについては、寒天培地ごと白金鉤で切り出した接種源を新たなPDA平板培地に接種・培養した後に3か月間7℃で保存した。その後、各菌株のコロニーからコルクボーラーで寒天培地ごと打ち抜くことで得た直径5mmの菌体ディスクをシイタケでは1枚のPDA平板培地、ヒラタケでは1枚のMA平板培地のそれぞれ中央部に1個接種して25℃における菌糸伸長能を測定した。菌体ディスク数の各反復数は3個とし、平板培地のシャーレ裏面に直交する直線を引き、菌体ディスクの縁からコロニーの先端までの4方向(半径方向)を経時的に10日間測定した(各測定データ数は12となる)。また、対照として各供試菌株の継代培養保存株のコロニーから得た菌体ディスクの菌糸伸長能も同様に測定した。

2. 結果と考察

2-1. 凍結保存菌株の生存率変化

(1) 前処理なしのシイタケとヒラタケの生存率変化

前処理なしで凍結保存した菌株の生存率変化をシイタケとヒラタケごとに、それぞれ表1と表2に

示す。表中の“100”は繰返し2回の測定で生存率100%のみ、“≤100”は生存率が0～100%で変動、“<100”は生存率が0～100%未満、“0”は生存率が0%のみを示している。凍結保護液と菌株の組合せによるが、生存率100%が維持されたのはシイタ

表1 4種類の凍結保護液を用いて-20°C凍結保存を行ったシイタケ菌株の生存率変化(前処理なし)

凍結保護液	供試菌株	前処理なし区の生存率 (%) ^{a, b)}			
		凍結期間 (週)			
		1	4	12	16
40% (w/w) グルコース 水溶液	ANCT-05072	100	100	≤100	≤100
	NBRC 30877	100	≤100	≤100	≤100
	NBRC 31107	<100	0	0	0
	NBRC 31864	≤100	<100	<100	0
40% (w/w) スクロース 水溶液	ANCT-05072	100	100	≤100	≤100
	NBRC 30877	100	100	≤100	<100
	NBRC 31107	100	0	0	0
	NBRC 31864	100	≤100	<100	0
40% (w/w) マルトース 水溶液	ANCT-05072	100	100	≤100	<100
	NBRC 30877	100	≤100	≤100	<100
	NBRC 31107	<100	0	0	0
	NBRC 31864	100	0	0	0
40% (w/w) トレハロース 水溶液	ANCT-05072	100	≤100	0	-
	NBRC 30877	100	≤100	0	0
	NBRC 31107	<100	0	0	-
	NBRC 31864	100	≤100	≤100	-

a) : 平板培地へ接種した1組5個の菌体ディスクの全てに菌系活着が生じると生存率=100%; b) : 2回の繰返し実験結果
注) 100: 2回の測定で生存率100%のみ, ≤100: 2回の測定で生存率が0～100%で変動, <100: 2回の測定で生存率が0～100%未満, 0: 2回の測定で生存率が0%のみ; -: 未測定

表2 4種類の凍結保護液を用いて-20°C凍結保存を行ったヒラタケ菌株の生存率変化(前処理なし)

凍結保護液	供試菌株	前処理なし区の生存率 (%) ^{a, b)}			
		凍結期間 (週)			
		1-2	4	8	12
40% (w/w) グルコース 水溶液	ANCT-15001	100	0	0	0
	NBRC 8444	<100	0	0	0
	NBRC 30160	<100	0	0	0
	Po 89-1	<100	0	0	0
40% (w/w) スクロース 水溶液	ANCT-15001	100	<100	0	0
	NBRC 8444	100	100	<100	<100
	NBRC 30160	<100	<100	<100	<100
	Po 89-1	<100	<100	0	0
40% (w/w) マルトース 水溶液	ANCT-15001	100	0	0	0
	NBRC 8444	100	<100	0	0
	NBRC 30160	<100	<100	<100	0
	Po 89-1	100	<100	0	0
40% (w/w) トレハロース 水溶液	ANCT-15001	<100	<100	<100	<100
	NBRC 8444	<100	<100	<100	<100
	NBRC 30160	≤100	<100	<100	<100
	Po 89-1	<100	<100	<100	<100

a) : 平板培地へ接種した1組5個の菌体ディスクの全てに菌系活着が生じると生存率=100%; b) : 2回の繰返し実験結果
注) 100: 2回の測定で生存率100%のみ, ≤100: 2回の測定で生存率が0～100%で変動, <100: 2回の測定で生存率が0～100%未満, 0: 2回の測定で生存率が0%のみ

ケとヒラタケのいずれも4週間保存までで、多くは1~2週間保存までであった。この結果は著者らのこれまでの報告^{3,4)}と同様であった(加えて、本誌**62**(6): 391-398, 2020.; **63**(3): 177-184, 2021.; **63**(5): 360-366, 2021. 参照)。なお、トレハロースとヒラタケの組合せは今回が初めてで、表2のようにNBRC 30160の1週間保存で生存率100%が1回得られたものの12週間経過までの生存率は4菌株共に不安定であった。

(2) 前処理ありのシイタケとヒラタケの生存率変化

25℃での前処理を24時間、48時間および72時

間行った後に-20℃凍結し、12週間保存、16週間保存および20週間保存した時点で各菌株の生存率変化を測定した。1種類の凍結保護液と供試菌株ごとの組合せを1つの基本単位(前処理時間と保存期間の違いで3×3=9の試験区あり)とし、一部でも生存率100%に至らなかった試験区を有す基本単位を選び出した。その結果をシイタケとヒラタケ別に、それぞれ表3と表4に示す。表3に示していないグルコースのANCT-05072とNBRC 30877の組合せ(2基本単位)、スクロースのNBRC 31107以外の3菌株の組合せ(3基本単位)、マルトースのNBRC 31864の組合せ(1基本単位)の計6基本単

表3 - 20℃凍結保存でのシイタケ菌株の生存率変化(前処理あり)

凍結保護液	供試菌株	25℃ 前処理時間 (h)	前処理あり区の生存率 (%) ^{a, b)}		
			凍結期間 (週)		
			12	16	20
40% (w/w) グルコース 水溶液	NBRC 31107	24	100	100	≤ 100
		48	100	100	100
		72	100	100	≤ 100
	NBRC 31864	24	100	≤ 100	≤ 100
		48	100	100	≤ 100
		72	100	100	≤ 100
40% (w/w) スクロース 水溶液	NBRC 31107	24	100	100	100
		48	100	100	≤ 100
		72	100	100	100
	ANCT-05072	24	100	100	100
		48	100	100	100
		72	100	100	≤ 100
40% (w/w) マルトース 水溶液	NBRC 30877	24	100	100	≤ 100
		48	100	100	100
		72	100	100	100
	NBRC 31107	24	≤ 100	≤ 100	< 100
		48	≤ 100	≤ 100	< 100
		72	≤ 100	≤ 100	< 100
40% (w/w) トレハロース 水溶液	ANCT-05072	24	≤ 100	≤ 100	≤ 100
		48	≤ 100	≤ 100	≤ 100
		72	≤ 100	≤ 100	≤ 100
	NBRC 30877	24	≤ 100	≤ 100	≤ 100
		48	≤ 100	≤ 100	≤ 100
		72	≤ 100	≤ 100	≤ 100
	NBRC 31107	24	0	0	0
		48	0	0	0
		72	0	0	0
	NBRC 31864	24	≤ 100	0	0
		48	≤ 100	≤ 100	0
		72	≤ 100	≤ 100	≤ 100

a): 平板培地へ接種した1組5個の菌体ディスクの全てに菌糸活着が生じると生存率=100%; b): 2回の繰返し実験結果
注) 100: 2回の測定共に生存率100%, ≤ 100: 2回の測定で生存率が0~100%で変動, < 100: 2回の測定で生存率が0~100%未満, 0: 2回の測定共に生存率が0%; 40% (w/w) グルコース水溶液のANCT-05072とNBRC 30877の生存率は全て100%, 40% (w/w) スクロース水溶液のANCT-05072・NBRC 30877・NBRC 31864の生存率は全て100%, 40% (w/w) マルトース水溶液のNBRC 31864の生存率は全て100%

表4 - 20°C凍結保存でのヒラタケ菌株の生存率変化 (前処理あり)

凍結保護液	供試菌株	25°C 前処理時間 (h)	前処理あり区の生存率 (%) ^{a, b)}		
			凍結期間 (週)		
			12	16	20
40% (w/w) グルコース 水溶液	ANCT-15001	24	100	≦ 100	≦ 100
		48	≦ 100	≦ 100	≦ 100
		72	100	100	≦ 100
	NBRC 8444	24	≦ 100	≦ 100	≦ 100
		48	≦ 100	≦ 100	≦ 100
		72	≦ 100	≦ 100	≦ 100
	NBRC 30160	24	< 100	< 100	< 100
		48	< 100	< 100	< 100
		72	≦ 100	≦ 100	≦ 100
	Po 89-1	24	≦ 100	< 100	< 100
		48	< 100	< 100	< 100
		72	≦ 100	≦ 100	< 100
40% (w/w) マルトース 水溶液	NBRC 30160	24	100	100	100
		48	100	100	≦ 100
		72	100	100	100
	Po 89-1	24	100	100	100
		48	100	100	≦ 100
		72	100	100	100
40% (w/w) トレハロース 水溶液	NBRC 30160	24	100	100	≦ 100
		48	100	100	100
		72	100	100	100
	Po 89-1	24	100	100	100
		48	100	100	100
		72	100	100	≦ 100

a) : 平板培地へ接種した1組5個の菌体ディスクの全てに菌系活着が生じると生存率=100% ; b) : 2回の繰返し実験結果
注) 100 : 2回の測定共に生存率100%, ≦ 100 : 2回の測定で生存率が0~100%で変動, < 100 : 2回の測定で生存率が0~100%未満, 0 : 2回の測定共に生存率が0%; 40% (w/w) スクロース水溶液の4菌株の生存率は全て100%, 40% (w/w) マルトース水溶液および40% (w/w) トレハロース水溶液のANCT-15001とNBRC 8444の生存率は全て100%

位の生存率は全て100%であった。同様に表4に示していないスクロースの4菌株の生存率, マルトースとトレハロースのANCT-05072とNBRC 8444の計8基本単位の生存率は全て100%であった。この合計14の基本単位においては前処理時間の差異が生存率に反映されないと判断した。

また、表3のマルトースとNBRC 31107の組合せ(1基本単位), トレハロースのANCT-05072, NBRC 30877およびNBRC 31107の組合せ(3基本単位)の計4基本単位, 表4のグルコースとNBRC 8444の組合せの合計5の基本単位では, 12~20週間保存で生存率100%を維持できなかったものの保存期間ごとの生存率表示が同一となったことから, 前処理時間の違いが各保存期間の生存率に殆ど影響を及ぼさないと判断できる。

各基本単位内において前処理時間の違いで同一保存期間の生存率が異なるものは, 表3のシイタケ

で6基本単位, 表4のヒラタケで7基本単位となる。この合計13の基本単位において前処理時間の長さが生存率の改善に多少でも寄与した可能性があるものは, 表3でグルコースとNBRC 31864の組合せ, マルトースとNBRC 30877の組合せおよびトレハロースとNBRC 31864の組合せ, 表4でグルコースとNBRC 30160の組合せおよびトレハロースとNBRC 30160の組合せの合計5つであった。特に表3のトレハロースとNBRC 31864の組合せでは, 前処理時間の長さがシイタケ菌株の生存期間(生存率: ≦ 100)を延ばした可能性が示された。反対に前処理時間の長さが生存率の低下を多少でも招いたものは, 表3でマルトースとANCT-05072の組合せおよび表4でトレハロースとPo 89-1の組合せの合計2つであった。

以上から25°Cで24~72時間の前処理を施すことで, 凍結保護液と菌種・菌株の組合せによって

生存期間の長さや生存率 100% 維持期間の長さが異なるものの、前処理なしと比べて-20℃で凍結保存での生存率が顕著に改善する^{3,4)}ことが確認された(加えて、本誌 62(6): 391-398, 2020.; 63(3): 177-184, 2021.; 63(5): 360-366, 2021. 参照)。一方、前処理の違いは供試菌株の-20℃凍結 20 週間保存までの生存率に明確な影響を与えなかったと判断する。加えてトレハロースとヒラタケの組合せは相性が良く⁵⁾、シイタケと比べて前処理を施すことで4菌株共に生存率 100% 維持期間が大幅に延びた。

2-2. 20 週間凍結保存後の菌体ディスクからの菌糸再生挙動 (前処理あり)

前処理あり・20 週間凍結保存後の菌体ディスクについて、25℃培養時の菌糸再生挙動例を図 1 と図 2 に示す。図 1 はシイタケの NBRC 31864 で、4 種類の凍結保護液について前処理時間ごとに上から 24 時間、48 時間および 72 時間における生存率の経時変化をまとめた。グルコースでは 48 時間処理のみが生存率 80% 止まりで、100% 到達は 24 時間処理の 7 日間に対して 72 時間処理が 3 日間となり培養日数の短縮がみられた。トレハロースでは 24 時間処理と 48 時間処理の生存率 0% に対し、72 時間処理が 2 日間で 100% に達した。スクロースとマルトースでは、それぞれ 2~3 日間と 2~4 日間で生存率 100% となった。

対照 (継代培養保存) の菌体ディスクでは培養開始後 2 日以内に生存率 100% に達する。凍結保存後の菌体ディスクからの菌糸再生が対照と比べて遅れる^{1,6)}のは、菌糸体が凍結ストレスを受け (細胞の損傷)、解凍・培養開始後にその回復に時間を必要とするためと推察できる。前報 (本誌 63(3): 177-184, 2021.; 63(5): 360-366, 2021. 参照) で述べたように-20℃凍結保存後の菌糸再生が改善されるのは、前処理によって菌体ディスク (栄養寒天培地と菌糸体) に取り込まれた糖分子によって凍結ストレスが緩和されるためと推察される。図 1 では 72 時間処理において菌体ディスクの菌糸再生が早く、3 日間の培養で各凍結保護液の生存率が 100% となり、前処理時間の長さが-20℃凍結保存の生存率改善に寄与したようにもみえる。しかし、スクロースで 24 時間処理と 72 時間処理が培養 2 日間、48 時間処理が培養 3 日間で生存率 100% に到達したこと

などから、トレハロースでの結果を除けば前処理時間と-20℃凍結 20 週間保存の菌糸再生挙動 (生存率) との関係は不明瞭である。

図 2 には、トレハロースを凍結保護液とした前処理あり・20 週間凍結保存後のヒラタケ 4 菌株の菌糸再生挙動をまとめた。25℃の前処理時間ごとに上から 24 時間、48 時間および 72 時間での各生存率の経時変化である。24 時間処理では 4 菌株共

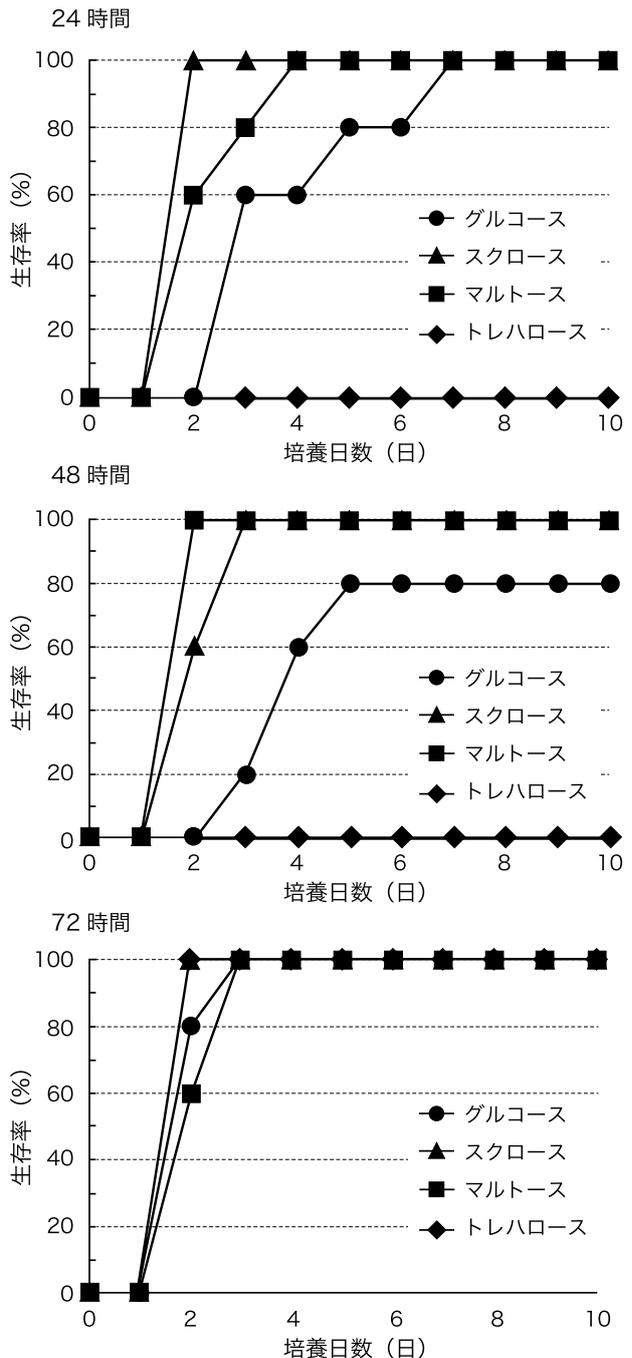


図 1 25℃前処理あり・20 週間凍結保存後のシイタケ菌株 NBRC 31864 菌体ディスクの凍結保護別の菌糸再生挙動 (25℃培養;上:前処理 24 時間, 中:同 48 時間, 下:同 72 時間)

に2日間で生存率100%に達し、48時間処理ではNBRC 8444とPo 89-1の菌糸再生が他の2菌株よりも遅れて5日間で生存率100%となった。72時間処理ではPo 89-1の菌糸再生が遅く生存率が80%止まりとなり、その他の菌株では2~3日間で生存率100%となった。Po 89-1では前処理時間の長さが菌糸再生挙動にマイナスの影響を与えたように見える。しかし、その他のヒラタケ3菌株では前処理時

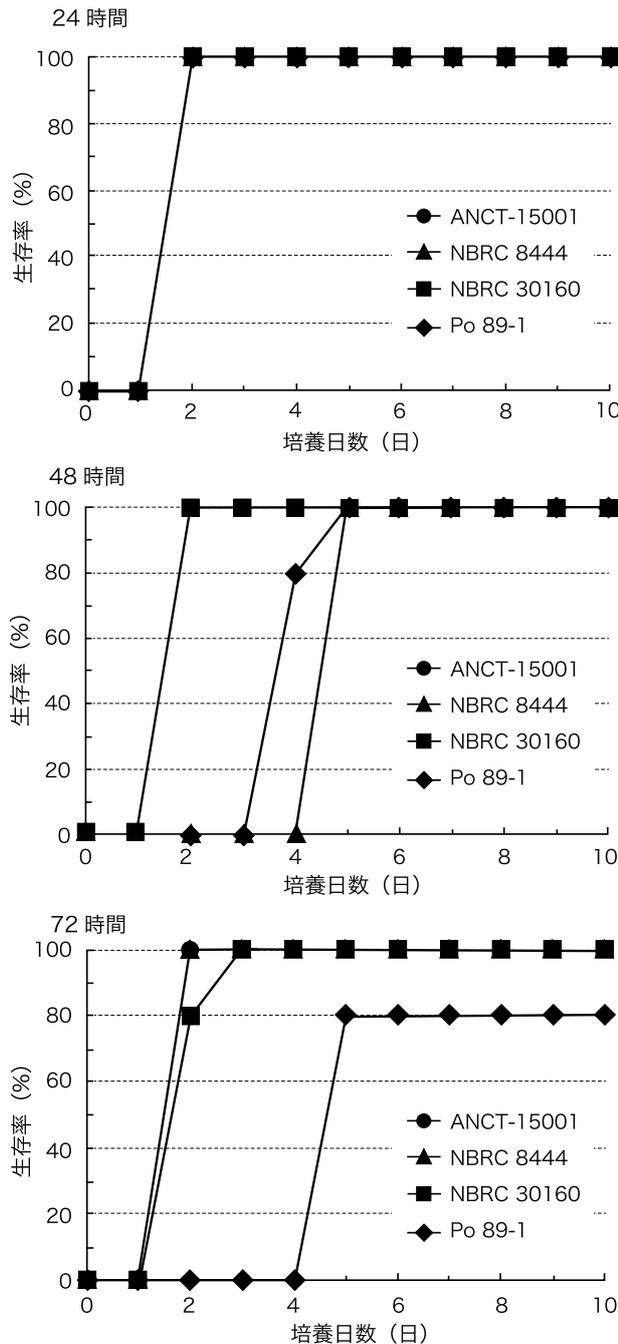


図2 40% (w/w) トレハロース水溶液使用の前処理あり・20週間凍結保存後の各菌体ディスクの菌糸再生挙動 (25°C培養;上:前処理24時間, 中:同48時間, 下:同72時間)

間の長さとして20週間保存後の菌糸再生挙動との関係は不明瞭である。

2-3. 20週間凍結保存菌株・再生菌糸体の25°Cでの菌糸伸長挙動 (前処理あり)

2-1 (2) に示した前処理あり・20週間凍結保存後の菌体ディスクについて、8菌株の各試験区の生存率100%が20週間ほぼ維持されたスクロースに注目し、前処理時間と凍結保存による菌株の変異の有無を観察した。具体的には、再生菌糸体の菌糸伸長挙動を25°Cで対照と比較した。これまでの報告^{1,4)}から凍結・解凍直後の菌体ディスクからの菌糸伸長挙動は、培養開始後に菌糸伸長が生じるまでの誘導期間が対照よりも長くなる (加えて、本誌55(1):

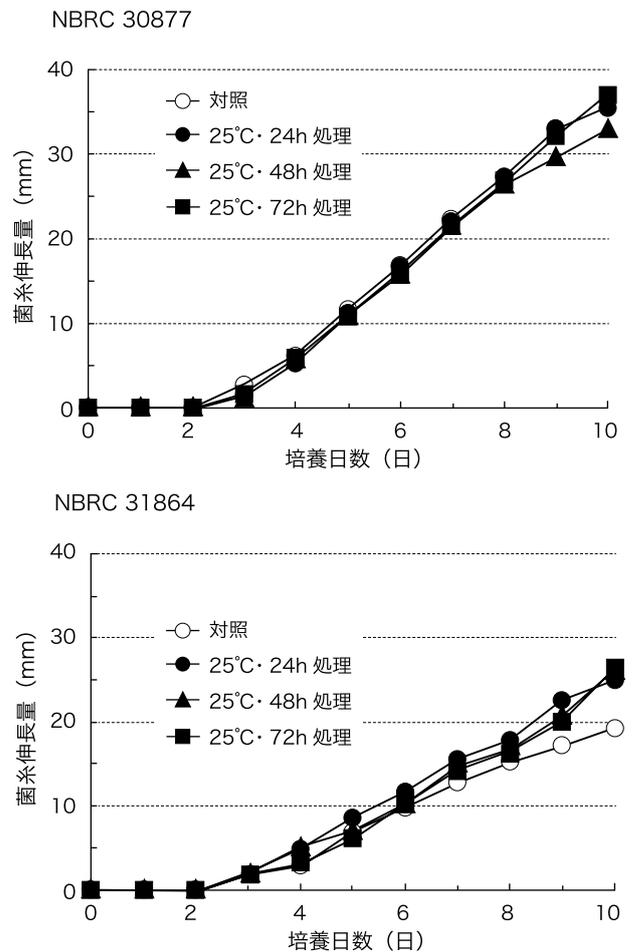


図3 40% (w/w) スクロース水溶液で-20°C・20週間凍結保存した菌体ディスクから得た再生菌糸体の菌糸伸長挙動 (25°C培養;上:NBRC30877, 下:NBRC 31864) 注) “対照”: 継代培養保存株; 25°C・24~72時間の前処理後に凍結保存した菌体ディスクの再生菌糸体をPDA培地で7°C・3ヶ月放置した菌株; 各PDA平板培地の反復数は3 (コロニーの半径方向測定データ数12)

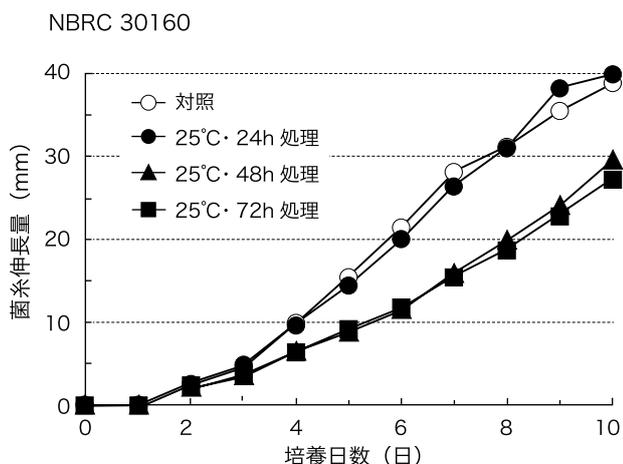
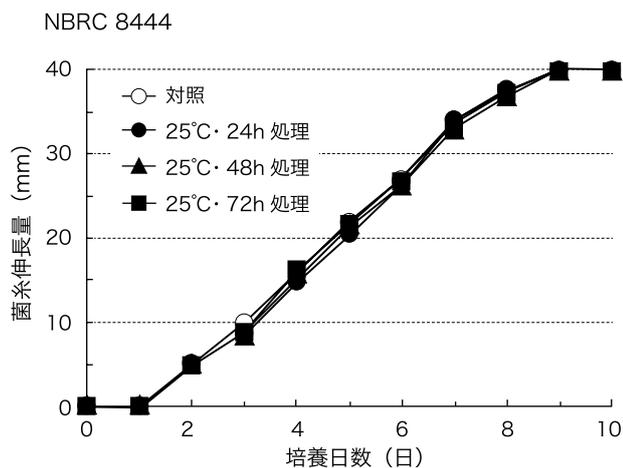


図4 40% (w/w) スクロース水溶液で-20℃・20週間凍結保存した菌体ディスクから得た再生菌糸体の菌糸伸長挙動 (25℃培養; 上: NBRC 8444, 下: NBRC 30160) 注) “対照”: 継代培養保存株; 25℃・24~72時間の前処理後に凍結保存した菌体ディスクの再生菌糸体を PDA 培地で7℃・3ヶ月放置した菌株; 各 MA 平板培地の反復数は3 (コロニーの半径方向測定データ数 12)

6-12, 2013.; 62(6): 391-398, 2020.; 63(3): 177-184, 2021. 参照)。そこで生存率測定後に新たな PDA 平板培地に接種・培養した再生菌糸体を7℃で3ヶ月間保存し、凍結ストレスの緩和を試みたコロニーから得た各菌体ディスクの菌糸伸長量を測定した。

シイタケの一例として, NBRC 30877 と NBRC 31864 の菌糸伸長挙動を各対照と共に図3に示す。菌株により経時的な菌糸伸長量に僅かな差はあるものの誘導期間の長さ, グラフの傾き (菌糸成長速度) は対照と比べて差異はみられない。図に示していない ANCT-05072 と NBRC 31107 についても同様の挙動で, かつ4菌株共に対照と凍結保存株のコロニー外観に差異はなかった。以上から, 前処理時間を変化させて凍結保存したシイタケ菌株に不可逆的な変異は生じていない可能性が高いと判断できる。

NBRC 8444



NBRC 30160

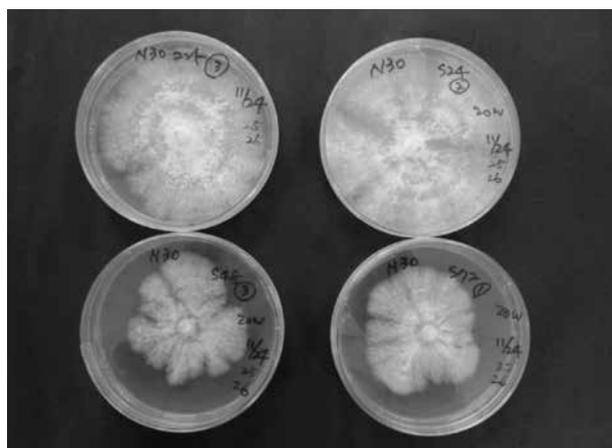


図5 NBRC 8444 (上) と NBRC 30160 (下) のコロニー外観 (MA 平板培地, 25℃・10日間培養, 左上の対照から時計回りに 24 h, 48 h, 72 h の前処理) 注) 40% (w/w) スクロース水溶液で-20℃・20週間凍結保存した菌体ディスクから得た再生菌糸体を7℃・3ヶ月放置した菌株

同様にヒラタケの一例として NBRC 8444 と NBRC 30160 の結果を図4に示す。上図の NBRC 8444 の各試験区では誘導期間とグラフの傾き共に対照と差異が殆どなく, 経時的な菌糸伸長量の測定値が重なった。下図の NBRC 30160 では誘導期間には差異がなかったが, グラフの傾きが2つのグループに分かれ, 対照と24時間処理の経時的な菌糸伸長量がほぼ同じ, 48時間処理と72時間処理の経時的な菌糸伸長量が小さい傾向を示した。なお, 図に示していない ANCT-15001 と Po 89-1 は NBRC 8444 と同様の挙動を示した。

図4に示した NBRC 30160 の菌糸再生挙動に前処理時間の長さが影響したか否かについて現時点での判断は難しい。しかし, 前処理 (48時間, 72時間) 単独または前処理と-20℃凍結20週間保存の

組合せによるストレスが多少なりとも残っていた可能性もある。図5に25°C・10日間培養後のNBRC 8444とNBRC 30160のコロニーの写真を示す。下図のNBRC 30160の48時間処理と72時間処理のコロニー面積が小さい。外観的には対照や24時間処理のものと比べた差異はないが、詳細な検討については今後の課題としたい。

おわりに

凍結保存によって菌糸体が死滅する主要原因としては、凍結により菌糸体細胞の内外に氷の核が形成し、それが結晶成長することによって細胞破壊（物理的なダメージ）が生じるため⁷⁾と考えられる。凍結保護液として4種類の高濃度糖水溶液を使用し、25°Cで前処理を施すことで菌体ディスク（寒天ゲルと菌糸体細胞）へより多くの糖分子を取り込ませ、凍結時の高浸透圧によって菌糸細胞からの脱水を促して細胞内のガラス化（細胞内の結晶化抑制）や細胞内の水分子の結合水化を促進^{8,9)}させる。さらに、寒天ゲル内の氷晶成長の抑制を図ることで菌糸細胞外部からの物理的ダメージが緩和³⁾され、菌糸体の生存率の改善へ至ると考えている。本研究では長期間の-20°C凍結保存を目指し、より望ましい前処理条件を明らかにするために25°Cでの24時間、48時間および72時間の放置効果を観察した。同時に、前処理時間の延長によって菌糸体へのストレス増大の可能性が考えられることから生存率の低下や変異の発現も想定した。

シイタケとヒラタケの合計8菌株共に、-20°C凍結保存において前処理なしと比べて前処理あり（25°C・24～72時間）の生存率が飛躍的に上昇することが確認された。前処理ありのシイタケでは

グルコースおよびトレハロースとNBRC 31864の組合せを含む3試験区において、前処理時間の長さと共に生存率が改善する傾向がみられた。しかし、前処理時間の延長と凍結保存後の菌糸再生挙動（菌体ディスクからの発菌と活着）には必ずしも明確な相関性がみられなかった。ヒラタケではグルコースおよびトレハロースとNBRC 30160の2試験区において、前処理時間の延長が生存率の改善に寄与した傾向がみられた。一方、凍結保存20週間後に全ての前処理で生存率100%を示したスクロースとNBRC 30160の組合せにおいて、再生菌糸体の菌糸伸長挙動では24時間処理と比べて48時間処理と72時間処理の25°Cでの菌糸伸長量が劣る傾向がみられた。

以上から、シイタケの-20°C凍結保存では25°C・24～72時間の前処理時間の違いよりも凍結保護液との組合せが生存率を支配しており、40% (w/w) スクロース水溶液の24時間処理が効果的かつ効率的と考えられる。ヒラタケの-20°C凍結保存でも25°C・24～72時間の前処理時間と生存率維持の関係は不明瞭であった。菌株により48～72時間の前処理が凍結保存後の菌糸伸長挙動に負の影響を与える可能性も示唆されたことから、スクロース、マルトースまたはトレハロース（いずれも二糖）の40% (w/w) 水溶液を用いて25°C・24時間の前処理を施すことが効果的かつ効率的と考えられる。

謝辞

ヒラタケ菌株Po 89-1を恵みいただいた（地独）北海道総合研究機構 林産試験場利用部・微生物グループの米山彰造 博士、実験支援をいただいた旭川高専・物質化学工学科の西脇綾乃氏に深謝する。

参考文献

1. Ohmasa M, Abe Y, Babasaki K, Hiraide M, Okabe K: Preservation of cultures of mushrooms by freezing. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **33**(4): 467-479, 1992.
2. 大政正武：遺伝資源研究 - 最近の進歩 (2)- 栽培きのこ菌株の超低温保存法の検討 -. 農業技術 **48**(2): 74-77, 1993.
3. 富樫 巖, 大谷和也, 安東敬史, 細川芽衣, 曾我 瞳 他：シイタケ菌糸体の -20℃凍結保存における高濃度糖水溶液と寒天培地の影響 . 日本菌学会会報 **57**(2): 93-98, 2016.
4. 富樫 巖, 新井 悠：-20℃凍結保存におけるヒラタケ菌糸体に対する高濃度グルコース水溶液の保護効果. 日本菌学会会報, **60**(2): 37-41, 2019.
5. Terashita T, Yoshida K, Suzuki A, Sakai T, Yoshikawa K, Nagai M: Effect on trehalose on the spawn storage in some edible mushroom fungi (2): Effect on preservation in the freezer. *Mycoscience* **44**(1): 71-74, 2003.
6. Ohmasa M, Tsunoda M, Babasaki K, Hiraide M, Harigae H: Fruit-body production of test cultures of *Flammulina velutipes* preserved for seven years by freezing at three different temperatures *Mycoscience* **37**(4): 449-454, 1996.
7. 白樫 了：糖類（トレハロース）の細胞内凍結抑制？. 生産研究 **55**(2): 150-152, 2003.
8. 渡辺 信：環境問題と微生物の保存. 環境技術, **27**(7): 485-487, 1998.
9. 桑野和可：藻類の凍結保存. 日本藻類学会創立 50 周年記念出版・21 世紀初頭の藻学の現況, 堀 輝三, 大野正夫, 堀口健雄共編. 山形, 日本藻類学会, 108-111, 2002.

高ポリアミン食の継続摂取によるアンチエイジング効果 —納豆を用いた介入試験—

早田 邦康 (SODA Kuniyasu)*

Key Words : 納豆, 高ポリアミン食, 異常メチル化, 長寿, スペルミン, スペルミジン

要約

長寿食として知られる日本食や地中海食には、ポリアミン (スペルミジンとスペルミン) が豊富に含まれている。合成ポリアミンを加えてポリアミン濃度を高くした餌をマウスに投与したところ、全血スペルミン濃度が上昇し、炎症が誘発されやすい状態が軽減され、加齢の原因の一つである遺伝子の異常メチル化が抑制されてマウスの寿命が延長した。そこで、ヒトにおけるポリアミン摂取の影響を検討するために、30名の健康な男性ボランティアにポリアミンが豊富な納豆を12ヶ月間摂取してもらった。この検討のために、大豆の選定から納豆製造方法までを検討し、最もポリアミン含有量が高く味のよい納豆を開発した。また、27名の男性ボランティアには対照群として参加してもらい、食生活を可能な限り変わらないようにして生活してもらった。参加したボランティアの年齢は48.9±7.9歳(40歳~69歳)であった。対照群として参加の2名の被験者は、研究途中で脱落した。研究開始後のスペルミジンとスペルミン摂取量の増加量は各採血時点の前の2週間の連続した食事の写真もしくは食事内容の記載から算出した。介入後の食事と介入前の食事内容を比較したところ、納豆摂取群の1日あたりのスペルミジンとスペルミンの摂取量は1日あたり96.63±47.70および22.00±9.56 μmol増加した。しかし、対照群ではほとんど変化がなかった。血液中のポリアミンは、大半が細胞に存在するために全血の濃度を高速液体クロマトグラフで測定した。納豆摂取群の全血スペルミン濃度は徐々に増加し、介入終了時点の12ヶ月後では、介入前の1.12±0.29倍となり、増加率は対照群より高かった ($p=0.019$)。全血スペルミジン濃度は両群ともに変化しなかった。

これまでの我々の研究結果からスペルミンの上昇によって免疫細胞のLymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) という炎症の誘発に関わるタンパクが減少することが分かっている。そこで、LFA-1の変化とポリアミン濃度の変化を検討した。フローサイトメトリーで測定した単球領域に存在する免疫細胞群表面のLFA-1量は、納豆摂取群において徐々に減少したが、対照群では変化がなかった。加齢とともにLFA-1は増加するが、介入前のLFA-1値から1年後のLFA-1の予測値を計算し、実測値と比較した。LFA-1は急性炎症により増加するので、その影響をhsCRPという体内の炎症の状態を鋭敏に反映するタンパクを指標にして急性炎症の症例を除外した場合、納豆摂取によってLFA-1の予測値より実測値が低くなるオッズ比が3.927 (95%CI 1.116-13.715) ($p=0.032$)となった。さらに、全症例を対象として、スペルミン/スペルミジン比の変化とLFA-1の変化の関係を検討したところ、両者の間には負の相関があった。本研究において観察されたこれらの所見は、高ポリアミン餌の継続摂取によるマウスの老化抑制と寿命延長で確認された所見と同様であった。また、これまでの研究成果から、スペルミン濃度上昇によるLFA-1量の減少はLFA-1プロモーター領域の高メチル化と遺伝子全体の異常メチル化の抑制を伴っていることがわかっている。よって、ヒトにおいても、高ポリアミン食の継続摂取が老化や寿命に密接な関係のある遺伝子全体の異常メチル化の抑制に寄与していることが示唆された。

* 聖蹟会埼玉県中央病院 病院長 (〒363-0008 埼玉県桶川市坂田1726), 自治医科大学 客員教授
e-mail : k.soda@seisekikai.com

はじめに

加齢に伴って炎症が誘発されやすい体内環境 (proinflammatory status) が形成されるようになるが、この状態が加齢に伴って進行する様々な疾患や老化の進行と関係があると考えられている^{1,2)}。すなわち、炎症が誘発されやすい体内環境であるために、軽微な刺激によって炎症が誘発されやすく、かつ刺激が繰り返されるために慢性的に経過する。この慢性的な炎症に伴う炎症性サイトカインなどのメディエーターの産生や酸化ストレスの発生は、細胞や遺伝子に損傷を与え、さらには組織や臓器の機能や構造に変化を及ぼし、様々な慢性疾患の誘発や老化の進行を促進させると考えられている。一方、このような体内環境を形成する要因や、生活習慣病進行の基礎的な背景として注目されているのが、加齢に伴って進行する遺伝子 (DNA) の異常メチル化である^{3,4)}。すなわち、なぜ加齢に伴って炎症が誘発されやすい状態になり、本来正常に修復されるはずの臓器や組織が変化してしまうのかという基礎的背景となっている。加齢に伴う異常メチル化とは、高齢者の DNA メチル化の状態を若年者のメチル化状態と比較した場合に、様々な部位で高メチル化と脱メチル化が生じていることをいう。DNA プロモーターとは、遺伝子情報の読み取り (遺伝子の転写) を制御し、結果として DNA にコードされている関連する蛋白の合成を調整する。原則として、DNA プロモーター領域の脱メチル化は転写を増強し、高メチル化は転写を減少させる。したがって、老化関連病理の進行に関与する遺伝子情報をコードした DNA の脱メチル化および生活習慣病抑止に関与するように作用する遺伝子情報をコードした DNA の高メチル化は、これらの生活習慣病や老化を促進することになる。実際、DNA 異常メチル化は、生活習慣病の進行やヒトの寿命と密接な関係があることが示されている^{5,6)}。

DNA 異常メチル化は様々な因子によって影響を受けることが明らかにされてきた。例えば、一卵性双生児は同じ遺伝子を持っているにも関わらず、加齢とともに罹患する疾患が異なり、容姿そのものも徐々に異なってくる。これらは、仕事や人を作るといわれていたように、生活環境が影響を及ぼすことが推測されてきた。食事内容もそのような変化に影響を与えることが示唆されてきたが、どのよう

な栄養成分が遺伝子異常メチル化や proinflammatory status を抑制するのは依然として明確ではない。健康長寿食として注目されている日本食や地中海食にはポリアミンという物質が豊富に含まれており、生活習慣病の抑制に寄与している可能性を私たちは報告した⁷⁾。代表的なポリアミンはアミノ基を3個もしくは4個有する、スペルミジン (Spermidine (SPD)) とスペルミン ((Spermine (SPM)) で、微生物からヒトまで全ての細胞で合成され、細胞の増殖、分化、細胞機能に必須の物質である。細胞内での合成に加えて、細胞は周囲からポリアミンを取り込むことができる。その中でも、腸管内のポリアミンは、生体内のポリアミンの主要な供給源であり、腸管から迅速に吸収され、全身の臓器や組織に分布する^{8,9)}。食品の中では、大豆などの豆類、キノコ類、野菜や小魚などの魚介類にポリアミンが多く含まれており^{10,11)}、地中海諸国と日本ではこれらの食材が好まれている⁷⁾。

これまで多くの研究で、ポリアミンは有害な刺激から細胞や遺伝子を保護し、生活習慣病の発症や老化の進行を抑制するように作用すると思われる生理活性が多数報告されていることを総説内で紹介している¹²⁾。ポリアミンは炎症性サイトカインの産生を強力に抑制する作用があるとともに、免疫細胞の表面に存在する蛋白である Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) の発現を減少させることを報告している^{13,14)}。LFA-1 は、細胞膜分化抗原と呼ばれている細胞表面に存在する細胞機能を発揮するための重要なタンパクの一つであるが、 α -L 鎖 (CD11a) と β -2 鎖 (CD18) の2つで構成される細胞接着に関与する膜タンパク質である。細胞の接着により、免疫細胞が活性化されて炎症性サイトカインなどのメディエーターが産生される。免疫細胞の LFA-1 発現量の増加は、免疫細胞の接着能を増加させるが^{15,16)}、加齢に伴って認められる炎症が誘発されやすい体内環境 (proinflammatory status) の特徴の1つである。われわれは、スペルミンがヒトの免疫細胞である末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) をはじめとする免疫細胞の LFA-1 発現量を濃度依存性に低下させ、その低下は免疫細胞の接着能の低下を伴っていることを報告した¹³⁾。

これらのポリアミンの生理活性から、ポリアミン

が健康長寿に関与しているのではないかと考え、マウスの餌に合成ポリアミンを加えて、大豆の2~3倍の濃度になるようにポリアミン濃度を調整してマウスに与えた。すると、高ポリアミン濃度の餌を与えたマウスでは、全血ポリアミン濃度が徐々に増加し、加齢に伴う病理学的変化が抑制された¹⁷⁾。動物の餌やヒトが摂取する食物中には、通常スペルミジンの濃度がスペルミンより高い。そこで、高ポリアミン餌の調整時には、通常のマウスの餌や我々の食物中に含まれるスペルミジン/スペルミン濃度比と同等になるようにスペルミジン濃度を高くしたが、全血濃度の明らかな上昇はスペルミンのみであった。さらに、高濃度ポリアミン餌を与えたマウスは、通常ポリアミン濃度餌や低ポリアミン濃度餌を与えたマウスよりも長生きした。また、高ポリアミン餌を食べたマウスでは、加齢に伴って生じる免疫細胞のLFA-1量の増加が抑制され、遺伝子レベルでは加齢に伴う遺伝子全体の異常メチル化の進行が抑制されていた¹⁸⁾。我々の細胞レベルでの検討では、ポリアミン合成抑制により生じる免疫細胞のLFA-1量の増加は、LFA-1プロモーターの脱メチル化とDNA全体の異常メチル化の亢進を伴っていた。一方、この細胞にスペルミンを投与することによって生じるLFA-1量の低下は、ポリアミンの合成を阻害した細胞で認められたLFA-1プロモーター領域の脱メチル化とDNA全体の異常メチル化の改善を伴っていた¹⁹⁾。

そこで、この研究では、高ポリアミン食の継続摂取が、ヒトの血中ポリアミン濃度とポリアミンの生理活性であるLFA-1の発現抑制を生じさせるかどうかを検討する。

1. 方法

1-1. 研究デザイン

ポリアミン濃度が通常の納豆より高い納豆を開発するために、ポリアミン濃度の高い大豆を検索し、その大豆を用いてポリアミン濃度が最も高くなる製造方法を開発した²⁰⁾。大豆と納豆菌は遺伝子組み換えではない天然のものを使用した。ポリアミン濃度の高い納豆上位4種類の味の評価を行い、介入試験に用いる納豆を選んだ。選んだ納豆は1880 nmol/gのスペルミジンと390 nmol/gのスペルミンを含んでいた。

この研究計画は、自治医大附属さいたま医療センターの倫理委員会で審査を受け、承認された。また、承認された研究計画は、日本医師会治験センター(JMACCT CTR)に登録した(試験ID: JMA-IIA00233, 試験名: 高ポリアミン食による生体内におけるポリアミン生理活性の検討(新規開発納豆を用いた介入試験))(URL: <https://dbcentre3.jmacct.med.or.jp/JMACTR/App/JMACTRS06/JMACTRS06.aspx?seqno=5483>)

女性は月経周期によって血中ポリアミン濃度が多少変化するため²¹⁾、40~70歳の健康な男性ボランティアを被験者とした。口頭と書面での研究内容の説明の後、各ボランティアには、本人の希望により納豆摂取群か対照群のどちらかに参加してもらった。納豆摂取群では、新規開発した高ポリアミン濃度納豆を、毎日45~90g(1~2パック)を1年間摂取してもらった。対照群に加わったボランティアには、研究参加後もそれまでの食事パターンを変えないように依頼した。納豆は研究班の納豆製造工場から直接ボランティアのもとに郵送した。すべての被験者には、おやつを含むすべての食事内容を写真撮影もしくは記述してもらった。食事内容は、研究開始前、および4, 8, 12ヵ月後の血液採取前の14日間連続で記録してもらった。

1-2. 血液検査

High-density lipoprotein (HDL) コレステロール(mg/dL) および Low-density lipoprotein (LDL) コレステロール(mg/dL) 濃度は直接法で、総コレステロール(T-Chol)(mg/dL) はコレステロール脱水素酵素を用いた Ultra Violet-End 法で測定した。高感度C反応性タンパク質(hs-CRP)(ng/mL) は、ラテックス免疫比濁法により測定した。ポリアミンを取り込んだ免疫細胞はリンパ球活性化が亢進することを見出していたので¹³⁾、コンカナバリンA(Con-A)の刺激に対する幼若化反応を測定した。刺激指数(Stimulation Index (SI)) は、Con-A刺激による³H-チミジン取り込み量を非刺激血液細胞の取り込みの量で割って求めた。これらの血液検査はエス・アール・エル(SRL, 東京)に委託した。

1-3. フローサイトメトリー

採取したボランティアの血液5 mLを直ちに5

mL の PBS で希釈した。あらかじめ SepMate-50™ (ベリタス社東京, 日本) の下室に 15mL の Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS, オスロ, ノルウェー) を充填しておき, 希釈した血液を SepMate-50 の上室の内側壁を伝わらせてそっと流し込んだ。その後, 1200×g で SepMate-50 を 10 分間遠心して, PBMCs を分離した。分離した PBMCs を回収し, PBS で 2 回洗浄後に, 1×10^7 個/mL の濃度で染色バッファー (BD フェーミンゲン™) に再懸濁した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合抗ヒト CD11a 抗体 (BD フェーミンゲン™) または Isotype コントロールを, 1×10^7 個あたり 20 μ L を細胞懸濁液に添加した。FACSscan フローサイトメーター (FACSVerse™) を用いて, リンパ球領域および単球領域にゲートされた 3×10^4 細胞の CD11a の発現を, ソフトウェア (BD FACSuite) を用いて解析し, 平均蛍光強度 (Mean fluorescent intensities (MFIs)) を求めた。

1-4. 全血ポリアミン濃度の測定

採血した血液を -80°C で保存した。血液中のポリアミンは, 大半が血液細胞内もしくは細胞膜に付着している²²⁾。血漿中にはごくわずかにしか含まれないので, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で計測した場合には, とくに SPM は基線の揺れ程度としてしか検出できず, 正確な数値を得るのは困難なこともある。そこで, 採取した血液は超音波による破碎処理と凍結と融解を繰り返し処理し, 全血ポリアミン濃度を測定した。ポリアミン濃度は HPLC で測定した。0.2 N トリクロロ酢酸 (TCA) を用いてホモジナイズしてポリアミンを抽出した後に, 27,000×g で 15 分間 (4°C) の遠心分離を行った。10 μ L の TCA 上清中のポリアミンを, 東洋ソーダ HPLC システムで TSK ゲル IEX215 カラム (4×80mm) を用いて, 50°C で分離した。バッファー (0.35 M citric acid buffer pH 5.35, 2 M NaCl, 20% methanol) の流量は 0.35mL/min とした。ポリアミンは, 0.06% の o-phthalaldehyde, 0.4 M boric buffer (pH 10.4), 0.1% Brij 35, および 37 mM 2-mercaptoethanol を含む溶液を用いて, 50°C でカラム溶離液の反応後に蛍光強度を検出した。o-phthalaldehyde 溶液の流量は 0.8mL/min とし, 励起波長 388nm, 蛍光波長 410nm で測定した。スペ

ルミジンとスペルミンの溶出時間は 15 分と 27 分であった。濃度はマイクロモラー ($\mu\text{mol} / 1\text{L}$ (μM)) で示した。

1-5. 統計分析

データはサンプル数 (n) の平均 \pm 標準偏差 (SD) で記載した。2 つのグループのデータが正規分布の場合には *t*-test, そうでない場合には Mann-Whitney 検定によって比較し, $p < 0.05$ で有意差ありとした。介入によるポリアミン濃度の変化と LFA-1 の変化の関係を線形回帰分析で分析した。また, 介入前の値をもとに加齢とともに増加する LFA-1 の介入終了後の予測値を求めた。その上で, 介入による LFA-1 上昇抑制効果を検討するために, 2×2 分割表によりオッズ比を求めた。

研究を脱落した被験者のデータについては, last observation carried forward method (LOCF) と mean imputation method (MIM) アプローチを用いて評価した。

2. 結果

2-1. 被験者および介入前のデータ解析

本研究の被験者として, 納豆摂取群に 30 名, 対照群に 27 名の男性が登録された。年齢は 40 歳から 69 歳までで, 年齢の中央値は 48.91 ± 7.89 歳であった。納豆群の平均年齢は 50.20 ± 7.85 歳で対照群の平均年齢は 47.48 ± 7.84 歳であり, 両群間に差はなかった ($p = 0.993$, *t*-test)。

介入前データを分析したところ, 年齢と全血のスペルミン (SPM) 濃度の間にはわずかな負の相関係数 (*r* 値) が認められたが, 統計学的有意差はなかった ($r = -0.150$, $p = 0.267$)。また, 回帰直線は SPM 濃度 = $2.505 - 0.012 \times$ 年齢であった (図 1a)。年齢と全血スペルミジン (SPD) 濃度の間には正の相関係数 (*r* 値) が認められたが, 統計学的有意差はなかった ($r = 0.142$, $p = 0.295$)。また, 回帰直線は SPD 濃度 = $3.419 + 0.025 \times$ 年齢であった (図 1b)。また, スペルミン/スペルミジン比 (SPM/SPD) と年齢の間には負の *r* 値を認めたが, 有意差は認められなかった ($r = -0.192$, $p = 0.154$)。また, 回帰直線は SPM/SPD 比 = $0.660 - 0.0045 \times$ 年齢であった (図 1c)。

単球領域における CD11a 平均蛍光強度 (MFIs)

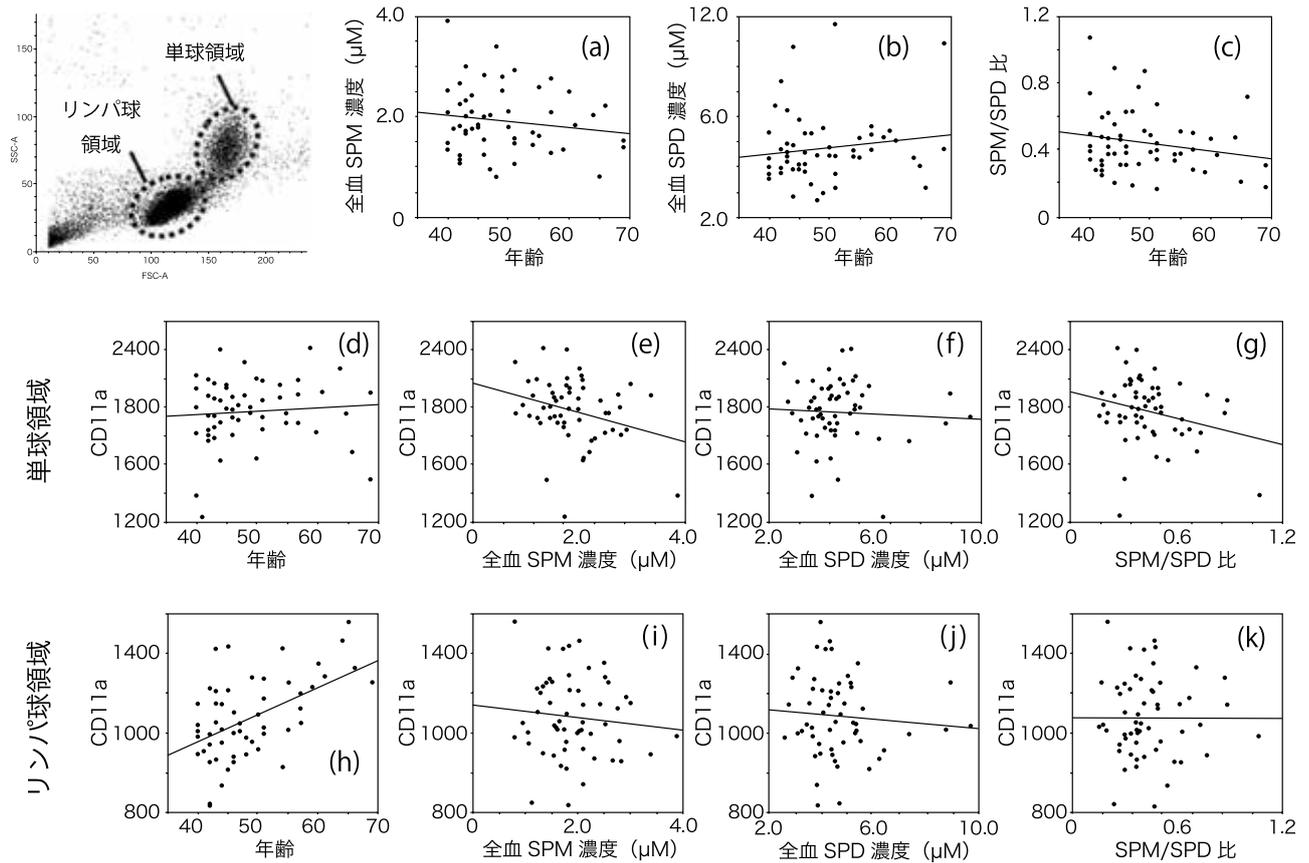


図1 介入前の測定値の解析

(a) 年齢と全血 SPM 濃度, (b) 年齢と全血 SPD 濃度, (c) 年齢と全血 SPM/SPD 比, (d) 年齢と単球 CD11a-MFIs, (e) 全血 SPM 濃度と単球 CD11a-MFIs, (f) 全血 SPD 濃度と単球 CD11a-MFIs, (g) 全血 SPM/SPD 比と単球 CD11a-MFIs, (h) 年齢とリンパ球 CD11a-MFIs, (i) 全血 SPM 濃度とリンパ球 CD11a-MFIs, (j) 全血 SPD 濃度とリンパ球 CD11a-MFIs, (k) 全血 SPM/SPD 比とリンパ球 CD11a-MFIs。

全血ポリアミン濃度は高速液体クロマトグラフィーで測定し, CD11a (=LFA-1) の発現強度 (平均蛍光強度 = MFIs) は FACSscan フローサイトメーター (FACSVerse) を用いて測定し, 分析ソフトウェア (BD FACSuite™) で解析した。SPM; スペルミン濃度, SPD; スペルミジン濃度。

と全血 SPM 濃度との間には負の相関を認め ($r = -0.287$, $p = 0.030$), 回帰直線は単球 CD11a-MFIs = $2163.00 - 100.97 \times \text{SPM}$ であった (図 1e)。また, 単球領域 CD11a-MFIs と SPM/SPD 比にも有意差は得られなかったものの, 負の相関係数が得られた ($r = -0.252$, $p = 0.058$) (図 1g)。全血 SPD 濃度と単球領域 CD11a-MFIs ($r = -0.059$, $p = 0.662$) と間には相関がなかった (図 1f)。年齢と単球領域 CD11a-MFIs との間にも相関関係はなかった ($r = 0.080$, $p = 0.557$) (図 1d)。

リンパ球領域内の細胞の CD11a 発現 (リンパ球 CD11a-MFIs) と年齢の間には正の相関関係が認められた ($r = 0.532$, $p < 0.001$)。しかし, リンパ球 CD11a-MFIs は, 全血 SPM ($r = -0.095$, $p = 0.482$) (図 1i), 全血 SPD ($r = 0.081$, $p = 0.550$) (図 1j), もしくは全血 SPM/SPD 比 ($r = -0.007$, $p = 0.960$) (図

1k) との間で相関関係を認めなかった。

2-2. 各時点での測定値

介入前, 介入後 4 ヶ月, 8 ヶ月, および 12 ヶ月後の各測定値を表 1 に示す。介入前における納豆群の平均全血 SPM 濃度は, 統計学的有意差はなかったものの対照群より低かった。介入に伴って納豆群の平均全血 SPM 濃度は徐々に増加し, 12 ヶ月後には対照群よりも高くなった (表 1) (LOFC 法で, $p = 0.958$ (介入 4 ヶ月目), $p = 0.835$ (介入 8 ヶ月目), $p = 0.692$ (介入 12 ヶ月後):MIM 法で $p = 0.982$ (介入 4 ヶ月目), $p = 0.842$ (介入 8 ヶ月目), $p = 0.675$ (介入 12 ヶ月後))。全血 SPD 濃度は期間を通して変化がなく, すべての時点で 2 つのグループの間に差がなかった。単球 CD11a-MFI は介入前および介入 4 ヶ月目の時点で, 納豆群が対照群より高い数値

を示した(表1)(介入前; $p=0.011$), (介入4ヶ月目; $p=0.019$)。一方, リンパ球 CD11a-MFI の値は両者の間で差は認められなかった。hs-CRP は12ヶ月後の時点で納豆群が介入群より高い値を示したが, 有

意な差はなかった。SI, HDL, LDL, T-Cho は, 全ての時点で2つの群の間で差がなかった(表1)。なお, 対照群にエントリーした2人の被験者は, 途中で研究から脱落した。

表1 各地点での測定値

群	介入前		4 カ月後		8 カ月後		12 カ月後	
	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照
参加者数	30	27	30	26	30	25	30	25
SPM	1.86 ± 0.60	1.99 ± 0.68	2.09 ± 0.88	2.13 ± 0.90	2.09 ± 0.72	2.04 ± 0.83	2.02 ± 0.67	1.93 ± 0.86
SPD	4.71 ± 1.40	4.57 ± 1.41	4.92 ± 1.65	4.50 ± 1.88	4.19 ± 1.28	3.86 ± 0.99	4.81 ± 1.18	4.44 ± 1.30
SPM/SPD	0.42 ± 0.18	0.46 ± 0.19	0.46 ± 0.23	0.50 ± 0.21	0.53 ± 0.23	0.55 ± 0.25	0.45 ± 0.20	0.46 ± 0.21
hs-CRP	1207 ± 4064	1316 ± 1494	1850 ± 3706	1562 ± 3925	743 ± 1369	819 ± 1098	3491 ± 10251	895 ± 1046
リンパ球 MFI	1083 ± 231	1075 ± 169	1103 ± 201	1090 ± 173	1052 ± 201	1016 ± 171	994 ± 176	999 ± 143
単球 MFI	2040 ± 186 ^{*1}	1892 ± 242	1852 ± 174 ^{*2}	1717 ± 242	1883 ± 200	1853 ± 172	1808 ± 177	1805 ± 193
SI	233 ± 105	214 ± 93	235 ± 64	209 ± 68	147 ± 50	159 ± 55	206 ± 85	193 ± 85
HDL	63 ± 15	65 ± 21	61 ± 16	58 ± 17	61 ± 18	58 ± 17	65 ± 21	63 ± 16
LDL	128 ± 39	121 ± 35	124 ± 32	123 ± 33	117 ± 28	119 ± 29	133 ± 37	131 ± 37
T-Cho	212 ± 43	208 ± 41	205 ± 34	201 ± 35	203 ± 34	196 ± 31	220 ± 39	217 ± 40

データは平均±標準偏差 (SD) で示す。各測定値の単位は2. 方法の項に記載。hs-CRP, リンパ球 MFI, 単球 MFI, SI, HDL, LDL, T-Cho は小数点以下を四捨五入して記載した。

リンパ球 MFI; リンパ球領域における CD11a の平均蛍光強度 (MFI), 単球 MFI; 単球領域における平均蛍光強度 (MFI), SPM; 全血スペルミン濃度, SPD; 全血スペルミン濃度, SPM/SPD; 全血スペルミン/スペルミジン比, hs-CRP; 高感度 C 反応性タンパク質, SI; Stimulation Index, HDL; 高感度リポタンパク質, LDL; 低密度リポタンパク質, T-cholesterol; 総コレステロール。

^{*1} $p=0.011$ (unpaired-t 検定), ^{*2} $p=0.019$ (unpaired-t 検定)

2-3. 介入後の各測定値の変化

介入前の各測定値を基準として、介入4ヵ月、8ヵ月、および12ヶ月後における各種測定値の変化を表2に示す。介入前の全血SPM値を1とした場合の介入4, 8, および12ヶ月後の納豆群の濃度はいずれの時点においても対照群より高く、12ヶ月後は統計学的な有意差をもって納豆群が高かった ($p=0.019$) (表2)。対照的に、全血SPD濃度はどちら

のグループでも変化せず、研究期間を通して2つのグループ間での差はなかった。納豆群における全血SPM/SPD比は、8ヶ月および12ヶ月で対照群よりも高くなる傾向があったが、有意性はなかった ($p=0.105$) (表2)。

納豆群のhs-CRPは、介入12ヵ月後の時点で上昇を認め、反対に対照群では低下していたために、差を認めた ($p=0.007$)。単球領域のCD11a-MFIは、

表2 介入後の測定値の変化

群	介入前		4ヵ月後		8ヵ月後		12ヵ月後	
	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照
参加者数	30	27	30	26	30	25	30	25
SPM	1	1	1.13 ± 0.32	1.07 ± 0.36	1.16 ± 0.32	1.04 ± 0.22	1.12 ± 0.29 ^{*1}	0.97 ± 0.19
SPD	1	1	1.04 ± 0.24	0.98 ± 0.28	0.90 ± 0.18	0.85 ± 0.13	1.04 ± 0.17	0.97 ± 0.20
SPM/SPD	1	1	1.09 ± 0.25	1.09 ± 0.23	1.31 ± 0.26	1.23 ± 0.21	1.09 ± 0.24	1.01 ± 0.13
hs-CRP	0	0	643 ± 5571	203 ± 4406	464 ± 4319	587 ± 1947	2734 ± 11253 ^{*2}	-510 ± 1589
リンパ球MFI	0	0	20 ± 102	13 ± 106	-31 ± 138	-62 ± 141	-88 ± 122	-79 ± 100
単球MFI	0	0	-188 ± 202	-169 ± 222	-157 ± 186	-36 ± 213	-232 ± 166	-83 ± 250
SI	0	0	2.2 ± 92.6	3.2 ± 89.3	-85.9 ± 115.6	-47.3 ± 71.3	-24.1 ± 134.5	-13.1 ± 78.7
HDL	0	0	-1.2 ± 7.0	-4.8 ± 6.4	-1.7 ± 7.8	-4.6 ± 8.1	2.6 ± 11.5	0.1 ± 7.9
LDL	0	0	-4.5 ± 26.9	-0.8 ± 19.00	-11.0 ± 26.5	-5.4 ± 17.1	4.6 ± 29.2	6.4 ± 20.6
T-Chol	0	0	-6.6 ± 28.1	-7.0 ± 27.8	-8.0 ± 30.3	-12.9 ± 24.3	7.7 ± 34.2	7.8 ± 26.6

各時点でのそれぞれの値は平均±SDで示した。SPD, SPM, およびSPM/SPD比は介入前値を1とした際の相対的な値で示し、それ以外の測定値は介入前後各地点における実測値と介入前の実測値との差で示した。各測定値の単位は2.方法の項目に記載。なお、表のスペースの都合上、hs-CRP, リンパ球MFI, 単球MFI, は小数点以下を四捨五入して記載し、SI, HDL, LDL, T-Cholは小数点1桁で記載。

リンパ球MFI; リンパ球領域におけるCD11aの平均蛍光強度 (MFI), 単球MFI; 単球領域における平均蛍光強度 (MFI), SPM; 全血スペルミン濃度, SPD; 全血スペルミン濃度, SPM/SPD; 全血スペルミン/スペルミン比, hs-CRP; 高感度C反応性タンパク質, SI; Stimulation Index, HDL; 高密度リポタンパク質, LDL; 低密度リポタンパク質, T-chol; 総コレステロール。

^{*1} $p=0.019$ (Mann-Whitney 検定), ^{*2} $p=0.007$ (Mann-Whitney 検定)。

納豆群において時間の経過とともに減少したが、対照群との間に統計学的な有意差は認めなかった。リンパ球領域の CD11a-MFI, SI, HDL, LDL および T-Chol の数値の変化は有意ではなく、納豆群と対照群で差がなかった (表 2)。

2-4. ポリアミン摂取量の変化と全血ポリアミン濃度の変化との関係

納豆群の 30 人の被験者と対照群の 24 人から評価可能な食事記録が提出された。被検者の中には介入

試験用に作成した納豆以外の市販の納豆を摂取している方がいたために、市販の納豆のポリアミン濃度は、各種納豆に含まれるポリアミン濃度の平均 (1400nmol/g SPD および 190nmol/g SPM) で摂取量を算出した。

図 2 は、LOCF アプローチを用いて評価した結果を示す。介入前後の食事記録を比較し、介入前後での同一食事内容の量の差と異なる食材を拾い上げ、ポリアミン摂取量の増減を求めた。これによって求めた納豆群における SPD および SPM 摂

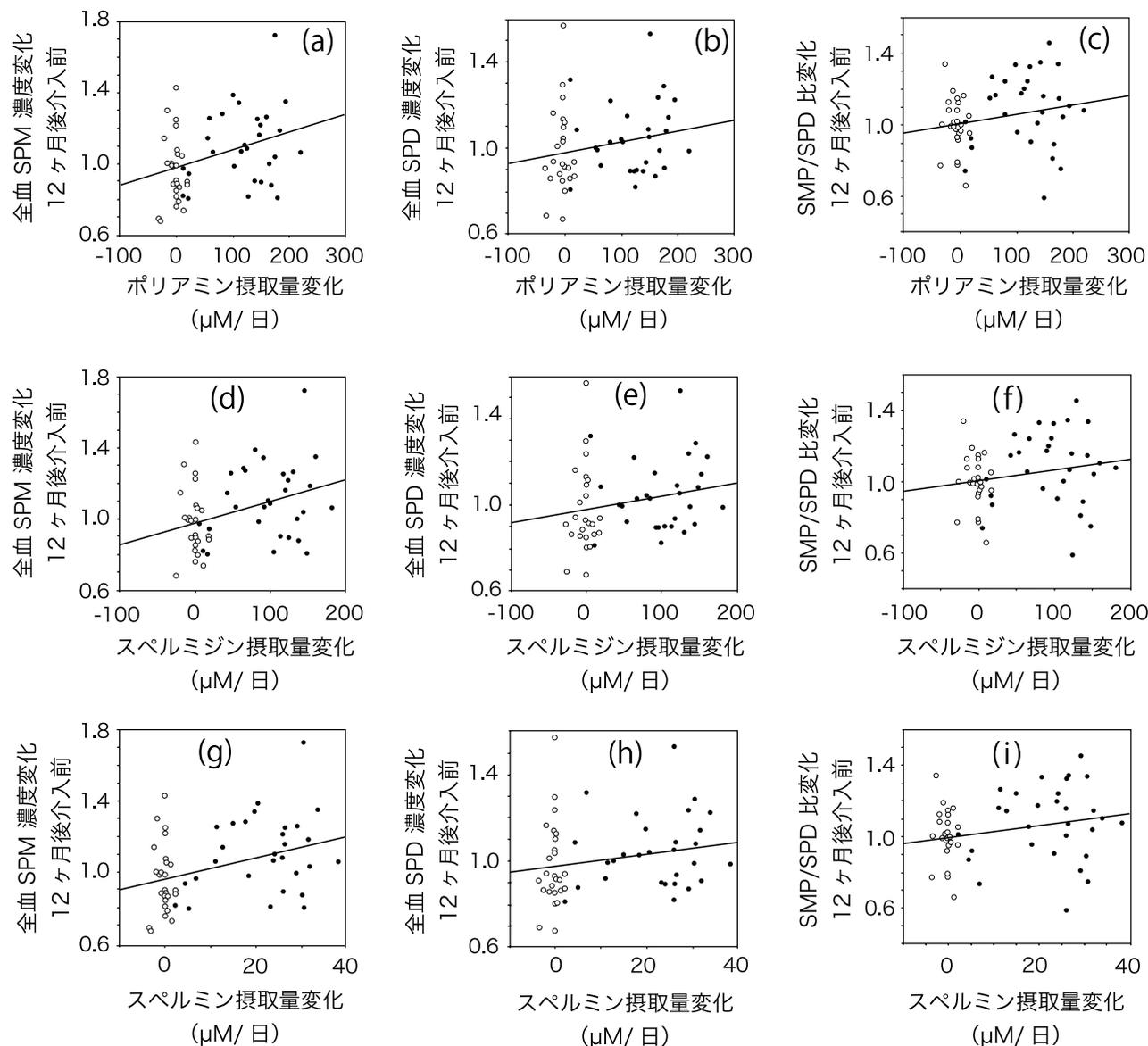


図 2 ポリアミン摂取量の変化と全血ポリアミン濃度の変化との関係 (LOCF アプローチ)

(a) ポリアミン摂取量の変化と全血 SPM 濃度の変化, (b) ポリアミン摂取量の変化と全血 SPD 濃度の変化, (c) ポリアミン摂取量の変化と SPM/SPD 比の変化, (d) SPD 摂取量の変化と全血 SPM 濃度の変化, (e) SPD 摂取量の変化と全血 SPD 濃度の変化, (f) SPD 摂取量の変化と全血 SPM/SPD 比の変化, (g) SPM 摂取量の変化と全血 SPM 濃度の変化, (h) SPM 摂取量の変化と全血 SPD 濃度の変化, (i) SPM 摂取量の変化と血液中 SPM/SPD 比の変化。ポリアミンの濃度は HPLC により測定した。SPM; スペルミン, SPD; スペルミジン。図中の白丸は対照群で黒丸は納豆群を示す。

取量の増加は 96.63 ± 47.70 および 22.00 ± 9.56 $\mu\text{mol}/$ 日であった。対照群においては、それぞれ -2.63 ± 11.60 および -0.34 ± 1.48 $\mu\text{mol}/$ 日であった。納豆群のポリアミン摂取量の増加量は対照群より明らかに多かった ($p < 0.001$)。

ポリアミン (SPD+SPM)、SPD および SPM 摂取量の変化 (介入 12 ヶ月後と介入前との差) と全血ポリアミン (SPD+SPM)、SPD および SPM 濃度の相対的变化 (介入前の濃度で 12 ヶ月後の濃度を割った数値) を比較した。ポリアミン (SPD+SPM) 摂取量の変化 (差) は、12 ヶ月の全血 SPM 濃度の変化 (率) と正の相関 ($r = 0.335$, $p = 0.015$) を有していた (図 2a)。ところが、ポリアミン摂取量の増加に呼応した全血ポリアミンの濃度の変化には大きな個人差があった。すなわち、同程度のポリアミン摂取量の増加があっても、全血 SPM 濃度の変化はボランティア間で大きく異なった。反対に、ポリアミン摂取量がほとんど変化しなくても全血ポリアミン濃度が変化している場合もあった。ポリアミン濃度を測定する際に、各測定時に分注して凍結保存した同じ血液サンプルのポリアミン濃度を測定し、測定の精度を確認していたが、共同研究者の五十嵐らが開発した本測定方法によるポリアミン濃度は極めて安定していて、正確な数値が得られることを確認している。ポリアミン摂取量の増加は、12 ヶ月後の全血 SPD 濃度 ($r = 0.215$, $p = 0.109$) (図 2b) や SPM/SPD 比 ($r = 0.214$, $p = 0.110$) (図 2c) の相対的な変化との間には正の相関係数が得られたが、統

計学的に有意な相関関係は認めなかった。

SPD 摂取量の変化と全血 SPM 濃度の変化の間には正の相関関係 ($r = 0.353$, $p = 0.007$) が認められた (図 2d)。また、SPD 摂取量の増加は全血 SPD 濃度 ($r = 0.215$, $p = 0.109$) (図 2e) および SPM/SPD 比の変化率 ($r = 0.209$, $p = 0.119$) (図 2f) との間で正の r 値を認めたが、統計学的には有意ではなかった。

介入による SPM 摂取量の変化は、介入後 12 ヶ月での全血 SPM 濃度の変化との間で正の相関関係 ($r = 0.364$, $p = 0.005$) を認めた (図 2g)。SPM 摂取量の増加は、全血 SPD の変化との間と ($r = 0.204$, $p = 0.128$) (図 2h) 全血 SPM/SPD 比の変化率との間で ($r = 0.234$, $p = 0.075$) (図 2i) 正の r 値を呈したが、統計的に有意な相関はなかった。

同様の解析を、介入群の 30 人のボランティアと対照群の 24 人の生データを用いて行った場合でも同様の結果であった。また、MIM アプローチを用いて評価した場合も、結果は同じであった。

2-5. 急性炎症を伴わない被験者における、単球領域 LFA-1 発現に及ぼす影響の評価

LFA-1 の発現は ITGAL と呼ばれる LFA-1 プロモーター領域のメチル化の状態によって影響を受けるが、同時に炎症の刺激によっても LFA-1 が細胞膜にシフトすることによって発現が急激に変化する。図 3 は同一人物の平熱時と発熱時に行った CD11a のフローサイトメトリーである。このように炎症は

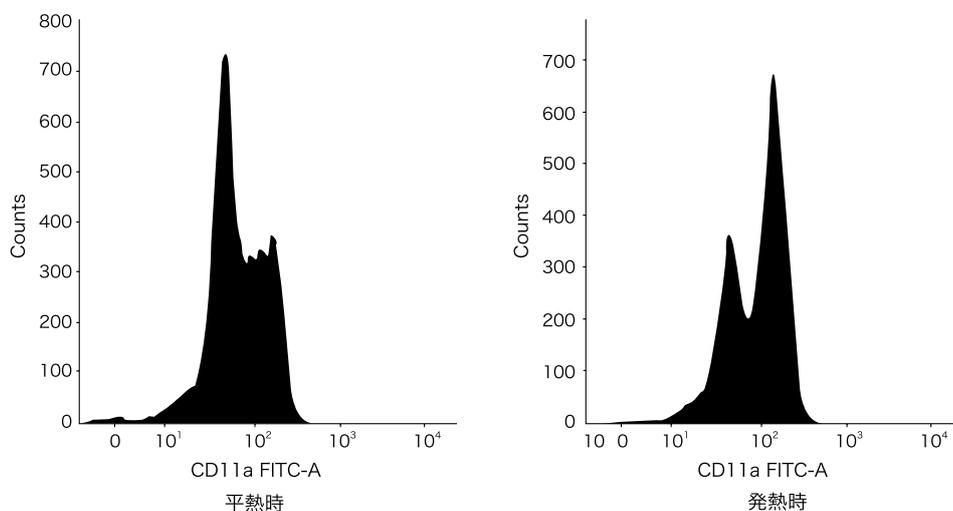


図 3 炎症による CD11a 発現への影響

同一被験者の末梢血単核球上の CD11a の発現を平熱時と発熱時にフローサイトメータで測定した。発熱 (炎症) により LFA-1 の発現に大きな影響のあることが分かる

LFA-1 発現を変化させ、CD11a-MFIs (LFA-1) の数値に影響を及ぼす。

hs-CRP は体内に存在する炎症の鋭敏なマーカーであり、急性炎症が生じると hs-CRP の急激な増加を伴うことが知られている。そこで、CD11a-MFIs に及ぼす急性炎症の影響を除外するために、4, 8, 12 ヶ月の各時点で介入前の hs-CRP 値から 3000ng/mL 以上変化 (増加または減少) した被験者を除外して分析を行った (表 3)。その結果、介入前の全血 SPM 濃度で介入 12 ヶ月後の SPM 濃度を割った数値の平均値は、納豆群で 1.08 ± 0.18 倍と有意に増加したが ($p = 0.019$)、対照群では 0.98 ± 0.20 倍と変化しなかった。納豆群の単球領域 CD11a-MFIs は介入により減少し、対照群における変化と比較すると低下の程度は明らかに大きかった ($p = 0.019$)。

すべての被験者を対象として、全血 SPM 濃度と単球領域 CD11a-MFIs の変化 (介入 12 ヶ月後と介入前の濃度の差) との間には負の相関係数が認められたが、統計学的に有意な相関ではなかった ($p = 0.114$)。フローサイトメトリーで用いる CD11a 抗体は、同じ会社から供給を受けていたが有効期限が限られており、研究を通して同じロットの抗体を使用することができない。一方、単球領域 CD11a-MFI は加齢によって発現の影響をほとんど受けない (図 1a)。そこで、用いた CD11a に対する抗体の抗体価の差や測定時の条件の違いを補正するために、介入前の単球領域 CD11a-MFIs を、介入前と 12 ヶ月後の間の平均 MFI の差 (-164.16) によって補正し、12 ヶ月後の CD11a-MFIs 推測値を求めた。hs-CRP の変化が介入前と 12 ヶ月後の間で 3000ng/mL より少ない (急性炎症の影響のない) ボランティアにおいて、介入後の実測値と上記で得られた推測値を比較した。納豆群では、実測値が推測値より高かったのが 5 名であったが、低かったのが 18 名であった。対照群では、実測値が推測値より高かったのが 12 名で、低かったのが 11 名であった。2×2 分割表解

表 3 急性炎症の影響を除外したボランティアにおける測定値の変化

群	介入前		4 ヵ月後		8 ヵ月後		12 ヵ月後	
	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照
参加者数	30	27	24	22	27	20	23	23
年齢	50.20 ± 7.85	47.48 ± 7.84	49.75 ± 7.79	46.82 ± 7.15	50.19 ± 8.09	48.85 ± 8.48	49.65 ± 7.67	47.96 ± 8.25
SPM 変化率	1	1	1.10 ± 0.33	1.04 ± 0.33	1.19 ± 0.33	1.07 ± 0.22	$1.08 \pm 0.18^{*1}$	0.98 ± 0.20
SPD 変化率	1	1	1.05 ± 0.25	0.95 ± 0.22	0.90 ± 0.18	0.85 ± 0.13	1.04 ± 0.17	0.96 ± 0.20
SPM/SPD 比変化率	1	1	1.05 ± 0.21	1.08 ± 0.16	1.33 ± 0.26	1.28 ± 0.20	1.05 ± 0.19	1.02 ± 0.13
hs-CRP 差	0	0	-500 ± 624.63	-109.68 ± 885.95	-46.70 ± 588.73	-160.85 ± 556.02	-32.87 ± 482.02	-139.35 ± 879.41
リンパ球 MFI 差	0	0	7.46 ± 104.56	17.46 ± 103.27	-38.52 ± 141.15	-65.90 ± 133.64	-99.00 ± 129.77	-70.83 ± 96.42
単球 MFI 差	0	0	-209.08 ± 214.63	-177.41 ± 222.79	-156.63 ± 196.33	-47.10 ± 226.90	$-247.83 \pm 148.76^{*2}$	-85.04 ± 257.39

データは平均 ± SD で表す。SPM, SPD, および SPM/SPD の数値は介入前の数値を基準として、各測定時点における変化率 (各時点における値 / 介入前値) として示し、hs-CRP 差、リンパ球 MFI 差、単球 MFI 差は各地点の測定値から介入前の測定値を引いた数値で示した。

SPM ; 全血スペルミン濃度, SPD ; 全血スペルミン濃度, SPM/SPD ; 全血スペルミン / スペルミジン比, hs-CRP ; 高感度 C 反応性タンパク質濃度, リンパ球 MFI ; リンパ球領域 CD11a-MFIs, ; 単球 MFI ; 単球領域 CD11a-MFIs.

*¹ $p = 0.019$ (Mann-Whitney 検定), *² $p = 0.007$ (Mann-Whitney 検定)

析 (Contingency table analysis) で解析したところ、納豆摂取によって単球領域 CD11a-MFIs を減少させるオッズ比は 3.927 (95% 信頼区間: 1.116-13.715) であった ($p = 0.032$)。すなわち、納豆食は LFA-1 値を低下させた。

2-6. 単球領域 LFA-1 発現に及ぼすポリアミン濃度変化の影響

hs-CRP の変化を指標として急性炎症を除外したボランティアにおける検討では、納豆摂取によって全血 SPM 濃度が上昇したボランティアにおいて、単球領域 CD11-MFIs が低下した (2-5. 急性炎症を伴わない被験者における、単球領域 LFA-1 発現に及ぼす影響の評価の項での 2×2 分割表解析)。そこで、さらに単球領域における LFA-1 発現に対するポリアミン濃度の変化の影響をさらに評価した。LOCF および MIM (表 4 括弧内の数値で示す) アプローチを用いて、全血 SPM 濃度、全血 SPD 濃度、全血ポリアミン濃度 (SPM+SPD)、および単球領域 CD11a-MFIs の介入前の値から各時点 (4, 8, および 12 ヶ月後) における数値の変化を表 4 に示す。

納豆群の 4 ヶ月後 (LOCF アプローチで $p = 0.063$, MIM によるアプローチで $p = 0.069$) および 8 ヶ月後 (LOCF アプローチで $p = 0.116$, MIM によるアプローチで $p = 0.129$) の全血 SPM 濃度の変化率の

平均値は対照群の変化率より大きかった。さらに、12 ヶ月後の変化では、納豆群における全血 SPM 濃度の変化率の上昇は対照群における上昇より有意に大きかった (LOCF アプローチで $p = 0.041$, MIM アプローチで $p = 0.042$)。納豆群の 4, 8, および 12 ヶ月における全血 SPD 濃度の変化率は、研究期間全体を通じて対照群と同等であった。全血 SPM/SPD 比の変化率は、納豆群で対照群よりわずかに高い傾向があったが、統計学的有意差は認められなかった。

介入群における介入 4 ヶ月後の単球領域 CD11a-MFIs の変化は、対照群と類似していた (LOCF アプローチで $p = 0.521$, MIM アプローチで $p = 0.647$)。しかし、介入群の単球領域 CD11a-MFIs の平均値は試験期間を通して減少傾向にあり、介入試験開始後 8 ヶ月後と 12 ヶ月後における減少の程度は対照群より明らかに大きかった (8 ヶ月後: LOCF アプローチで $p = 0.020$, MIM アプローチで $p = 0.026$) (12 ヶ月後: LOCF アプローチで $p = 0.006$, MIM アプローチで $p = 0.010$)。

LOCF アプローチでの各数値の変化の関係を線形回帰分析 (linear regression analysis) で検討した。血液 SPM 濃度の介入後 12 ヶ月後での変化の値 (12 ヶ月 - 介入前) と単球領域 CD11a-MFIs の介入後 12 ヶ月後での変化の値 (12 ヶ月 - 介入前) と

表 4 両群における介入後の測定値の変化

群	4 ヶ月後 - 介入前		8 ヶ月後 - 介入前		12 ヶ月後 - 介入前	
	納豆	対照	納豆	対照	納豆	対照
SPM (MIM)	0.12 ± 0.26	0.001 ± 0.22 (-0.01 ± 0.26)	0.23 ± 0.43	0.06 ± 0.38 (0.06 ± 0.40)	0.16 ± 0.37 ^{*1}	-0.045 ± 0.38 (-0.05 ± 0.40)
SPD (MIM)	-0.18 ± 0.58	-0.27 ± 0.51 (-0.20 ± 0.60)	-0.52 ± 0.90	-0.73 ± 0.79 (-0.70 ± 0.84)	-0.09 ± 0.76	0.20 ± 0.80 (-0.12 ± 0.87)
SPM/SPD (MIM)	1.13 ± 0.16	1.07 ± 0.14 (1.06 ± 0.16)	1.29 ± 0.23	1.21 ± 0.21 (1.21 ± 0.22)	1.08 ± 0.21	1.01 ± 0.13 (0.99 ± 0.15)
単球 CD11aMFI (MIM)	-188 ± 202	-152 ± 221 (-163 ± 219)	-157 ± 205 ^{*1}	-33 ± 205 (-38 ± 208)	-232 ± 166 ^{*2}	-76.6 ± 240.9 (-86.1 ± 240.1)

対照群の上段のデータは LOCF アプローチ, 下段カッコ内のデータは MIM アプローチによる。納豆群に脱落例はなかった。LOCF; last observation carried forward method, MIM; mean imputation method。

数値は介入後の数値の介入前の数値からの変化を示す。各数値は平均値 ± SD として表示。SPM; 全血スペルミン濃度の介入前との差, SPD; 全血スペルミジン濃度の介入前との差, SPM/SPD; 全血スペルミン / スペルミジンの比の介入前からの変化率, 単球 CD11aMFI; 単球領域における LFA-1 (CD11a) 発現強度の変化 (差)。^{*1} $p < 0.05$, ^{*2} $p < 0.01$, 両者とも unpaired t 検定による。

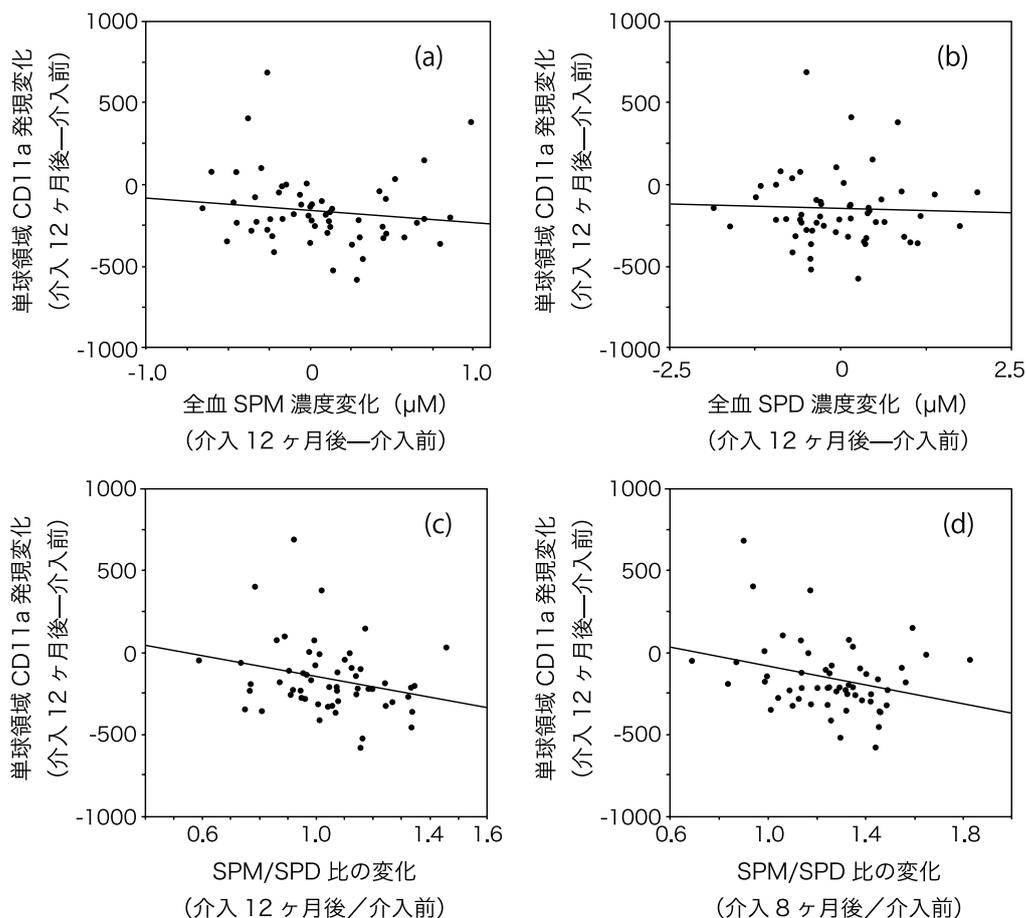


図4 単球領域における全血ポリアミン濃度の変化と LFA-1 発現の変化との関係

(a) 介入 12 ヶ月後における全血 SPM 濃度の変化と介入 12 ヶ月後における単球領域 CD11a-MFIs の変化; (b) 介入 12 ヶ月後における全血 SPD 濃度の変化と介入 12 ヶ月における単球領域 CD11a-MFIs の変化; (c) 介入 12 ヶ月における全血 SPM/SPD 比の変化率と 12 ヶ月における単球領域 CD11a-MFIs の変化; (d) 介入 8 カ月後における全血 SPM/SPD 比の変化率と 12 ヶ月における単球領域 CD11a-MFIs の変化。

の間には、負の r 値を認めた ($r = 0.134$, $p = 0.322$) (図 4a)。一方、血液 SPD 濃度の 12 ヶ月後の変化と単球領域 CD11a-MFIs の変化の間には、相関 ($r = 0.027$, $p = 0.843$) を認めなかった (図 4b)。介入前に対する介入後 12 ヶ月での血液 SPM/SPD 比の変化率と単球領域 CD11a-MFIs の値の変化の間には、負の r 値を認めた ($r = -0.250$, $p = 0.061$) (図 4c)。我々は、スペルミン濃度の上昇が DNA メチル化基転移酵素 (DNA methyltransferase 3A および 3B) を活性化し、その結果遺伝子全体のメチル化を制御し、LFA-1 プロモーター領域をメチル化することを報告した。しかし、この変化は直ちに認めるわけではなく、培養細胞およびヒト末梢血単核細胞を用いた検討でもスペルミン濃度の増加によって LFA-1 量の減少が生じるまでには比較的長い時間を有することを報告している¹³⁾。そこで、介入 12 ヶ月後の LFA-1 の変化とそれに先行する介入 8 ヶ

月後の全血ポリアミン濃度および SPM/SPD 比の変化を比較した。介入 12 ヶ月後の単球領域 CD11a-MFIs の変化と介入 8 ヶ月後の全血 SPM 濃度の変化の間には負の r 値を認めたものの有意差はなかったが ($r = -0.176$, $p = 0.191$)、介入 12 ヶ月後の SPM/SPD 比の値の変化の間には負の相関を認めた ($r = -0.283$, $p = 0.033$) (図 4d)。

3. 考察

ポリアミンに関する過去の論文のタイトルや要旨には、ポリアミン合成能とポリアミン濃度は加齢とともに減少することが記載されている。確かに、酵素活性、特にポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ornithine decarboxylase (ODC)) の活性は加齢とともに低下することが分かっている。しかし、これらの記述を論文の本文で読み解くと、ほとんどすべての論文が加齢に伴うポリアミン

濃度の低下は認められないことを明らかにしている。とくに、SPD 濃度は全く低下せず、むしろ増加する臓器や組織も存在する。例えば、西村らはマウスの各組織および臓器内のポリアミン濃度を計測し、生後3週目の若年マウスと比較すると、10週齢および26週齢のマウスではポリアミン濃度が有意に低いことを報告している、しかし、成長した後の、10週齢と26週齢のマウスを比較したところ、皮膚の濃度は低下するものの、他の臓器や組織では、SPD および SPM 濃度の差は認められないことを明らかにしている²³⁾。他の多くの論文でも同様であり、例えば最も多く検討されているヒトでは、成人を対象に検討した場合、血中ポリアミン濃度および尿ポリアミン排泄量の年齢に伴う減少は認められていない^{13, 24-26)}。一方、これらの検討で指摘されているのは、SPD および SPM 濃度や排泄量の大きな個人差である^{13, 24)}。この大きな個体差は研究の際に留意する必要がある、一つの個体の経過を追えない場合の少数例の検討では、個体（症例）の選択によっては濃度の平均値に大きな変化が生じることになる。ポリアミン研究者による長年にわたるポリアミンの臨床応用の検討の結果、ポリアミン濃度の変化は一症例の経過を追う際には治療効果や再発の指標となることが分かった。しかし、癌細胞は多量のポリアミン、特に SPD を合成するという事実にも関わらず、ポリアミン濃度の大きな個人差により癌の存在診断への応用も困難であった。本研究でも、対象となった成人男性においては、全血中の SPD および SPM 濃度の加齢に伴う減少は認められず、大きな個人差が認められた。

これまでの我々の研究成果では、ヒト末梢血単球において、SPM が LFA-1 発現を抑制する細胞群と老化に伴って LFA-1 が増加する細胞群とは異なっていることを指摘している¹³⁾。本研究では、血液採取直後に PBMCs を短時間で分離し、PBMCs が採血管や分離用チューブの壁に接触する時間を極力短縮した。チューブ内のように体内とは異なる環境は PBMCs を刺激すると考えられるが、この刺激がどんなに弱くても炎症性サイトカインなどのメディエーターの産生を促し、その産生を介して LFA-1 発現を増強することは容易に考えられる。一方、ポリアミン、特に SPM には強力な炎症性サイトカイン産生抑制作用があるために、ポリアミン濃度の高

い環境では炎症性サイトカインの産生が抑制され、結果として LFA-1 の発現増強が抑制される¹⁴⁾。試験管内での刺激の影響を極力排除した本研究の結果、SPM と加齢が LFA-1 の発現に影響を及ぼす細胞群を明らかにすることができた。すなわち、リンパ球領域の細胞では加齢とともに LFA-1 の発現が増加するものの、ポリアミンによる影響はうけなかった。一方、単球領域の細胞は、加齢に伴う LFA-1 発現の変化は認められないものの、SPM 濃度依存性に LFA-1 発現が減少することが明らかになった。

本研究の問題点は、研究が無作為割付け試験で施行できなかったことである。納豆は独特の臭いがするために、この種の他の食べ物と同様に、その嗜好には大きな個人差がある。そのために、無作為割付けによって納豆を忌み嫌うボランティアが納豆食群に割り当てられたとき、納豆の長期（1年間）継続摂取という困難な課題によって脱落者が多くなることが推測された。そこで、納豆を1年間食べることが可能であることを表明したボランティアに納豆食群に参加してもらい、他のボランティアは対照群に参加してもらった。その結果、納豆群の脱落者はなく、ヒトにおける長期的な高ポリアミン食の摂取の影響を明らかにできた。日本人における食品からの SPD と SPM の摂取量の平均は、それぞれ 36 と 74 $\mu\text{mol/日}$ であると報告されている¹⁰⁾。本研究で用いた高濃度ポリアミン含有納豆からの SPD および SPM 摂取量は、平均的な日本人による1日の SPD および SPM 摂取量に匹敵することがわかった。すなわち、本研究の納豆群のボランティアは平均的な日本人が摂取するポリアミン量の2倍を摂取していたことになる。納豆に含まれる SPD は SPM の 4～5 倍の量であるが、高ポリアミン納豆の摂取で全血 SPD 濃度はまったく増加しなかった。SPD を多く含む高ポリアミン食の摂取がなぜ SPM 濃度だけを増加させるのかはわかっていない。しかし、我々の以前の動物実験でも同様の結果を示しており、合成ポリアミンを通常の成分で構成されるマウスの餌に添加して、SPD を 1540 nmol/g および SPM を 374 nmol/g の濃度に上昇させた餌でマウスを長期間（26週間）飼育したところ、やはり全血 SPM 濃度のみが有意に増加した^{18, 27)}。ヒトと異なったのは、マウスでは全血 SPD が上昇する個体が少数認められた。

本研究で明らかになったように、ポリアミン摂取量の増加はそのまま全血 SPM 濃度に反映されるわけではない。これは、マウスを使った検討でも同様で、同じ環境で生まれ育ったマウスに同じ餌を与えたにもかかわらず、全血 SPM 増加の程度には個体差が認められた^{17,18)}。細胞外からのポリアミン供給は、細胞内ポリアミン濃度に大きな影響を及ぼす。また、体内の局所におけるポリアミン合成の増加は全身のポリアミン濃度に影響を及ぼす。このことは、癌患者に典型的に見られる現象であり、癌細胞による活発なポリアミン合成によるポリアミン（特に SPD 濃度）の供給によって、血中ポリアミン濃度および尿中ポリアミン排泄量が増加する。特に、癌細胞内での活発なポリアミン合成を反映して SPD 濃度の上昇が顕著である。これらの事実を考慮すると、高ポリアミン食（納豆）の継続摂取が全血 SPM 濃度を増加させたということは、腸管内からの SPM 供給が増加したことを推測させる。腸管内からのポリアミン供給は体内のポリアミン供給源としては最も重要であり、摂取した食物に含まれるポリアミンと微生物によって新たに合成されたポリアミンの2つが供給源と考えられている。この分野での興味深い研究成果としては、腸内ポリアミン合成における腸内細菌叢の重要性が報告されていることである²⁸⁾。松本らは、プロバイオティクスの投与によってヒトおよび動物の糞便中のポリアミン濃度が上昇するが、その際には SPM 濃度だけが增加することを報告している^{29,30)}。しかし、一方では、プロバイオティクスおよび腸内細菌自体は SPM を合成できないことも報告している。これらのことから、腸管粘膜、腸内細菌叢、および腸肝循環などといった腸内環境が SPM 合成に重要な役割を演じていることが推測できる。

ポリアミンである SPD と SPM は類似の生物学的な活性を有する。しかし、PBMCs や培養免疫細胞を用いた実験では、SPD の生物学的活性は SPM より弱いことを指摘してきた。例えば、SPD も炎症性サイトカイン産生や LFA-1 発現を減少させる活性を有するが、その効力があきらかになるには、2～3 倍の濃度の増加が必要になる¹³⁾。このような大きな濃度変化は生体内ではほとんど認めることはない。しかし、SPM は細胞内濃度が約 1.2～1.3 倍に上昇しただけで、強力な生理活性を発揮する¹³⁾。

本研究では、納豆の摂取によって全血 SPM 濃度は 1.1 倍以上に増加したが、SPD は増加せず、ポリアミン摂取量の増加によって誘導される生物学的効果が主に SPM に起因することは明らかである。

LFA-1 タンパク発現量は、ITGAL (LFA-1 プロモーター) のメチル化によって調節されるだけでなく、細胞内シグナル伝達によっても制御されており³¹⁾、炎症は LFA-1 発現量を増加させる。したがって、血液採取時における急性炎症の有無を、炎症を鋭敏に反映する hs-CRP の変化を参考にして判断した。この急性炎症の影響を除外した検討では、全血 SPM の増加によって LFA-1 が減少する傾向にあることが明らかになった。また、全症例を対象に行った検討でも、LFA-1 発現の変化と全血 SPM 濃度の変化もしくは全血 SPM/SPD 比の変化との間には負の相関を確認することができた (図 3)。これらの知見は、我々がおこなった基礎研究および動物実験の結果と同様であり、老化に伴う LFA-1 の増加や DNA 全体の異常メチル化が、SPM 濃度上昇によって抑制され、LFA-1 のタンパク量が減少したことと一致する所見であった¹⁷⁾。

加齢に伴う DNA 全体のメチル化状態の変化は、多くの脊椎動物の組織で認められ^{32,33)}、加齢に伴って発症する生活習慣病の発症とその病態の進行や老化の進行と密接な関係のあることが指摘されている³⁴⁻³⁶⁾。我々の検討では、老化に伴って生じるポリアミン不足やポリアミンの合成抑制をした細胞で認められる DNA 全体の異常メチル化 (脱メチル化の進行と別の部位での高メチル化の進行) は、LFA-1 プロモーター領域の脱メチル化の増加を伴っていた。LFA-1 プロモーター領域の脱メチル化によりタンパク合成も促進されることが推測されるが、実際に LFA-1 量は増加していた。これに対し、SPM によって誘導される LFA-1 発現の低下は、ポリアミン不足によって生じた DNA 全体の異常なメチル化の増加と LFA-1 プロモーター領域の脱メチル化の解消と LFA-1 蛋白量の減少を伴っていることを報告した¹⁹⁾。これらのことから、今回の高ポリアミン食（納豆）摂取による SPM 濃度の上昇と同時に認められた LFA-1 のタンパク量の減少は、ゲノム全体の異常なメチル化の抑制と関連していることを示している。どの部位の遺伝子発現の促進や抑制が寿命延長をもたらすのかを解明するのは今後

の課題であり、現在でも多くの研究者が検討を続けている。その研究者たちの一致した意見は、少なくとも一つの遺伝子の変化が寿命に影響を及ぼすことは、現時点における研究成果からは想定できないということである。

おわりに

高ポリアミン食である納豆の継続摂取によって、血中スペルミン濃度が上昇し、スペルミン濃度の上昇によって誘発される LFA-1 のタンパク量が減少した。

参考文献

1. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G.: Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*. **908**: 244-254, 2000.
2. Collerton, J., Martin-Ruiz, C., Davies, K., Hilkins, C.M., Isaacs, J., Kolenda, C., Parker, C., Dunn, M., Catt, M., Jagger, C., *et al.*: Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: Cross-sectional findings from the Newcastle 85+ Study. *Mech. Ageing Dev.* **133**: 456-466, 2012.
3. Lopez-Candales, A., Hernandez Burgos, P.M., Hernandez-Suarez, D.F., Harris, D.: Linking chronic inflammation with cardiovascular disease: From normal aging to the metabolic syndrome. *J. Nat. Sci.* **3**: e341, 2017.
4. Fougere, B., Boulanger, E., Nourhashemi, F., Guyonnet, S., Cesari, M.: Chronic inflammation: Accelerator of biological aging. *J. Gerontol.* **72**: 1218-1225, 2017.
5. Marioni, R.E., Shah, S., McRae, A.F., Chen, B.H., Colicino, E., Harris, S.E., Gibson, J., Henders, A.K., Redmond, P., Cox, S.R., *et al.*: DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* **16**: 25, 2015.
6. Maeda, M., Moro, H., Ushijima, T.: Mechanisms for the induction of gastric cancer by Helicobacter pylori infection: Aberrant DNA methylation pathway. *Gastric Cancer* **20**: 8-15, 2017.
7. Binh, P.N.T., Soda, K., Kawakami, M.: Mediterranean diet and polyamine intake: Possible contribution of increased polyamine intake to inhibition of age-associated disease. *Nutr. Diet. Suppl.* **3**: 1-7, 2011.
8. Bardocz, S., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A.: Luminal and basolateral polyamine uptake by rat small intestine stimulated to grow by Phaseolus vulgaris lectin phytohaemagglutinin in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**: 46-52, 1990.
9. Bardocz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A., Ralph, A.: The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br. J. Nutr.* **73**: 819-828, 1995.
10. Soda, K., Mogi, S., Shiina, M., Nao, K.: The Polyamine content in various foods on a calorie basis. *J. Food Nutr.* **5**: 3106, 2018.
11. Nishibori, N., Fujihara, S., Akatuki, T.: Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chem.* **100**: 491-497, 2007.
12. Soda, K.: Polyamine metabolism and gene methylation in conjunction with one-carbon metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 3106, 2018.
13. Soda, K., Kano, Y., Nakamura, T., Kasono, K., Kawakami, M., Konishi, F.: Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte. *J. Immunol.* **175**: 237-245, 2005.
14. Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P.S., Botchkina, G., Soda, K., Bianchi, M., Ulrich, P., Cerami, A., Sherry, B., *et al.*: Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: A counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.*, **185**: 1759-1768, 1997.
15. Powers, D.C., Morley, J.E., Flood, J.F.: Age-related changes in LFA-1 expression, cell adhesion, and PHA-induced proliferation by lymphocytes from senescence-accelerated mouse (SAM)-P/8 and SAM-R/1 substrains. *Cell Immunol.* **141**: 444-456, 1992.
16. Chiricolo, M., Morini, M.C., Mancini, R., Beltrandi, E., Belletti, D., Conte, R.: Cell adhesion molecules CD11a and CD18 in blood monocytes in old age and the consequences for immunological dysfunction. Preliminary results. *Gerontology* **41**: 227-234, 1995.
17. Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., Konishi, F.: Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp. Gerontol.* **44**: 727-732, 2009.
18. Soda, K., Kano, Y., Chiba, F., Koizumi, K., Miyaki, Y.: Increased polyamine intake inhibits age-associated alteration in global DNA methylation and 1, 2-dimethylhydrazine-induced tumorigenesis. *PLoS ONE* **8**: e64357, 2013.
19. Kano, Y., Soda, K., Konishi, F.: Suppression of LFA-1 expression by spermine is associated with enhanced methylation of ITGAL, the LFA-1 promoter area. *PLoS ONE* **8**: e56056, 2013.
20. Kobayashi, K., Horii, Y., Watanabe, S., Kubo, Y., Koguchi, K., Hoshi, Y., Matsumoto, K.I., Soda, K.: Comparison of soybean cultivars for enhancement of the polyamine contents in the fermented soybean natto using Bacillus subtilis (natto). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**: 587-594, 2017.
21. Gilad, V.H., Halperin, R., Chen-Levy, Z., Gilad, G.M.: Cyclic changes of plasma spermine concentrations in women. *Life Sci.* **72**: 135-141, 2002.
22. Cooper, K.D., Shukla, J.B., Rennett O.M.: Polyamine distribution in cellular compartments of blood and in aging erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.* **73**: 71-88, 1976.
23. Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., Igarashi, K.: Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J. Biochem.* **139**: 81-90, 2006.

24. Elworthy, P., Hitchcock, E.: Polyamine levels in red blood cells from patient groups of different sex and age. *Biochim. Biophys. Acta* **993**: 212-216, 1989.
25. van den Berg, G.A., Muskiet, F.A., Kingma, A.W., van der Slik, W., Halie, M.R.: Simultaneous gas-chromatographic determination of free and acetyl-conjugated polyamines in urine. *Clin. Chem.* **32**: 1930-1937, 1986.
26. Yodfat, Y., Weiser, M., Kreisel, M., Bachrach, U.: Diamine and polyamine levels in the urine of healthy adults. *Clin. Chim. Acta* **176**: 107-113, 1988.
27. Soda, K., Kano, Y., Sakuragi, M., Takao, K., Lefor, A., Konishi, F.: Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **55**: 361-366, 2009.
28. Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A., Kitada, Y., *et al.*: Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci. Rep.* **4**: 4548, 2014.
29. Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y.: Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**: 181-186, 2001.
30. Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H., Benno, Y.: Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS ONE* **6**: e23652, 2011.
31. Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K., McDowall, A.: T-cell integrins: More than just sticking points. *J. Cell Sci.* **116**: 4695-4705, 2003.
32. Vanyushin, B.F., Tkacheva, S.G., Belozersky, A.N.: Rare bases in animal DNA. *Nature* **225**: 948-949, 1970.
33. Wilson, V.L., Smith, R.A., Ma, S., Cutler, R.G.: Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J. Biol. Chem.* **262**: 9948-9951, 1987.
34. Hai, Z., Zuo, W.: Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* **456**: 69-74, 2016.
35. Ono, T., Uehara, Y., Kurishita, A., Tawa, R., Sakurai, H.: Biological significance of DNA methylation in the ageing process. *Age Ageing* **22**: S34-S43, 1993.
36. Chen, B.H., Marioni, R.E., Colicino, E., Peters, M.J., Ward-Caviness, C.K., Tsai, P.C., Roetker, N.S., Just, A.C., Demerath, E.W., Guan, W., *et al.*: DNA methylation-based measures of biological age: Meta-analysis predicting time to death. *Ageing* **8**: 1844-1865, 2016.

本研究の内容を御理解いただく上で、下記の日本語総説をご参照ください。

- 早田邦康：ポリアミンによるアンチエイジング—遺伝子修飾作用—。 *New Food Industry.* **55**(8): 1-10, 2013.
- 早田邦康：食成分と健康長寿—レスベラトロールの研究結果を中心に—。 *New Food Industry.* **55**(4): 14-20, 2013.
- 早田邦康：ポリアミンの生物活性—生活習慣病予防と寿命延長に関して—。 *New Food Industry.* **57**(2): 13-26, 2015.
- 早田邦康：ポリアミンによる発癌抑制。 *New Food Industry.* **60**(2): 1-16, 2018.
- 早田邦康：食成分であるポリアミンによる健康長寿の背景—ポリアミン代謝と遺伝子メチル化、および one carbon metabolism について：(その 1) *New Food Industry.* **61**(2): 83-94, 2019.
- 早田邦康：食成分であるポリアミンによる健康長寿の背景—ポリアミン代謝と遺伝子メチル化、および one carbon metabolism について：(その 2) *New Food Industry.* **61**(3): 189-216, 2019.

生体防御機能の基礎知識

大谷 元 (OTANI Hajime) (信州大学 名誉教授)

Key Words: 母乳, 生体調節機能, 自然免疫, 獲得免疫, 抗原, 抗体

1. 哺乳動物の生体防御機能としての免疫

哺乳動物に限らず、生物が健全な生活を営むには生体調節機能が秩序正しく働かなくてはなりません。それらの機能の中でも、自己の細胞が異常増殖することの抑制、病原性微生物や寄生虫などに感染することの阻害、過剰免疫反応の抑制などを行う機能を生体防御機能と呼んでいます。

放線菌や乳酸菌が抗生物質やバクテリオシンなどの抗菌性物質を生産することや、植物が活性酸素や抗菌性物質であるファイトアレキシンを生成することは自己を存続させるための生体防御機能です。哺乳動物もリゾチームやトランスフェリンなどの抗菌性物質により、感染防御を行っています。しかし、哺乳動物の体は、微生物や植物と比べると複雑にできているために、生体防御機能も複雑になっています。

哺乳動物で最も重要な生体防御機能は獲得免疫系です。獲得免疫系は脊椎動物に固有で、ヤツメウナギよりも進化した動物に備わっています。

本項では、哺乳動物の生体防御機能、特に免疫系の基本的事項を紹介します。

(1) 免疫事始

1) 経験で知る免疫現象

“免疫”という二つの漢字の間にレ点を入れて漢文調に読むと、“疫を免れる”となります。すなわち、“免疫”とは“病気にかからないこと”を意味しています。

現在は義務付けられていませんが、著者が子供の頃には、小学校に入学すると校医さんにより腕に小

さな注射をされました。2日後に注射した個所に赤い腫れがあるかどうかを観察され、赤い腫れがある時はその直径が測られました。しかし、赤い腫れがない時や、あってもその直径が非常に小さい時は、BCG と呼ばれる大きな注射を肩にされました。そして1年が経ち2年生になると、1年前にBCGを注射された生徒は、再び腕に小さな注射をされ、赤い腫れの直径が測られました。腫れがない時や、その直径が非常に小さい時は、前年度と同様に、肩に大きな注射をされました。この行為は、赤い腫れの直径が一定の大きさに達するまで、毎年繰り返されました。

この一連の行為は、ツベルクリン検査とBCG接種と呼ばれるもので、結核予防のために免疫力をつけるためのものです。BCG接種はワクチン接種なのです。

私たちの体内に結核菌とチフス菌が初めて侵入した時には、それらを識別してどちらかの細菌だけを選択的（免疫用語で“特異的”と言います）に攻撃する物質はありません。しかし、反復して同じ病原菌が体内に侵入すると、その病原菌を特異的に攻撃する物質が体内に作られます。図2-1に示したように、ツベルクリン検査は、結核菌を特異的に攻撃する物質が体内にできているかどうかを調べる検査です。

最初に腕に行った小さな注射器の中には、感染力のない結核菌の成分が入っています。しかし、感染力は無くとも体内に入ると、私たちの体はそれを自己にとって異物（免疫用語で“抗原”と言います）と認識して、破壊するための様々な感染防御物質を

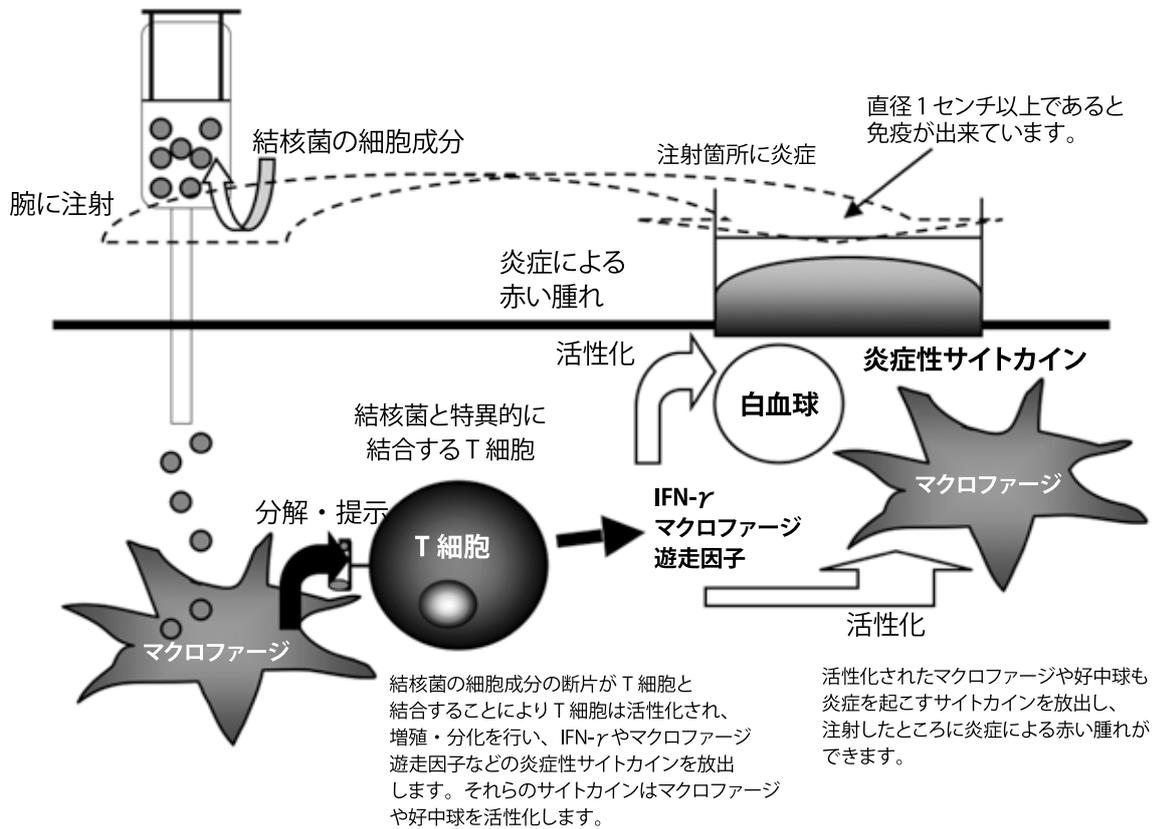


図 2-1 ツベルクリン検査のしくみ

注射した場所に集めます。結核菌を特異的に攻撃する物質が体内に作られていた時は、注射箇所が赤く腫れます。したがって、最初の注射後 2 日目に測定した赤い腫れの直径が一定以上あった人は、結核菌を特異的に攻撃する物質が体内に作られていたことを意味しています。

赤い腫れは、結核菌の攻撃により出来た炎症反応です。攻撃物質が多く出来過ぎ、炎症反応が強すぎて自己の組織に危害を与えることを“アレルギー”と言っています。

ツベルクリン検査により、弱い炎症反応を人為的に起こさせ、結核菌に対する免疫が出来ているかどうかの確認を、小学校に入学した時に以前は義務付けていました。ところが、ツベルクリン検査により、アレルギーを生じる児童がいることから、ツベルクリン検査の義務付けは、今は無くなりました。

医療技術が発達し、食生活が改善されたことにより、結核で死亡する人は激減しました。しかし、今から 50 年余り前までは、日本人の死亡原因のトップは結核でした。日本人の 1000 人に 1 人が結核で死亡していました。

2) 学習能力のない免疫系と学習能力のある免疫系

ツベルクリン検査は、結核菌を特異的に攻撃する物質が体内に作られているかどうかを調べるものです。しかし、免疫を担っている物質は、以前に侵入したことがある病原性生物を特異的に攻撃する物質だけではありません。

例えば、体内に結核菌とチフス菌が同時に初めて侵入した時は、それらの細菌は体内の同じ物質によって攻撃されます。その物質は、その人がそれまでどのような病原性生物と遭遇したかという経歴とは関係なく、全員の人が共通して持っているものです。この免疫に関係する物質は、同じ病原性生物が何度侵入を繰り返しても、その病原性生物を特異的に攻撃することはできません。このような物質による免疫系を、“自然免疫”と呼んでいます。

一方、以前に体内に侵入したことがある病原性生物は、自然免疫による攻撃に加えて、その病原性生物に特異的な物質による攻撃を受けます。このような病原性生物の 2 度目以降の侵入時に、特異的に攻撃する物質による免疫系を、“獲得免疫”と呼びます。前述したツベルクリン検査で調べた攻撃物質は、獲得免疫によるものです。

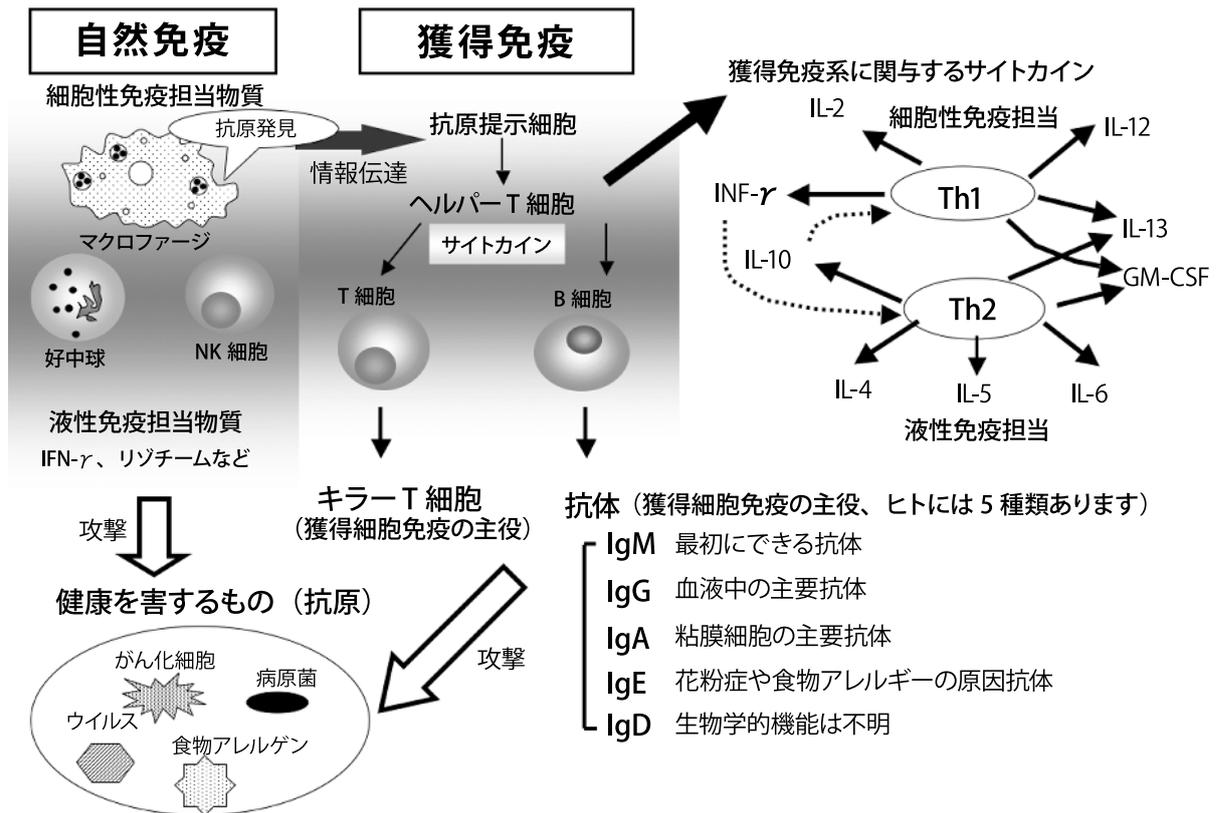


図 2-2 免疫系の分類と免疫担当物質

すなわち、免疫系は図 2-2 に示したように、自然免疫と獲得免疫に大別されます。前者は同じ病原性生物が繰り返し侵入しても、その攻撃力は変わらない学習能力（記憶力）のない免疫です。一方、後者は以前に侵入した病原性生物を覚えておき、再度侵入した時に、その病原性生物を特異的に攻撃する物質を作る学習能力（記憶力）のある免疫です。

自然免疫は、病原性生物の種を問わず、何にでも攻撃できるところが長所です。しかし、破壊力が獲得免疫よりも弱いところに短所があります。

免疫に関する物質は血液やリンパ液に溶解しているものと、それらに溶解できず浮遊しているものに大別されます。溶解している物質による免疫を、“液性免疫”と呼び、浮遊しているもの、すなわち、細胞による免疫を、“細胞性免疫”と呼んでいます。

自然免疫も獲得免疫もともに、液性免疫と細胞性免疫に分かれます。そのために、免疫系は、記憶力のない自然液性免疫と自然細胞性免疫、記憶力のある獲得液性免疫と獲得細胞性免疫に分類できます。一般に体内に病原性生物が侵入すると、これらが協力的に働いて感染防御を行います。

3) インフルエンザウイルスやガン細胞の攻撃に効果的な自然細胞性免疫: ナチュラルキラー細胞のパワー

細胞性免疫を担う細胞は、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞, 好中球 (ミクロファージ), マクロファージ (単核球), キラー T 細胞などです。これらの細胞は、血液やリンパ液に浮遊して全身を循環し、分泌液や臓器の中に入り込みます。

これらの細胞のうち、キラー T 細胞だけが獲得免疫に関係する細胞で、キラー T 細胞以外の細胞は、基本的には自然免疫に関係する細胞です。自然免疫に関係する細胞の中でもマクロファージとミクロファージは、ガン細胞やウイルス感染細胞を細胞内に取り込んで食作用により無毒化します。一方、NK 細胞は、細胞外に放出する物質によりガン細胞やウイルス感染細胞を無毒化します。

NK 細胞の“natural”は、“自然”という意味ではなく、“生まれつき”と言う意味です。したがって、NK 細胞は“生まれつきの殺し屋”細胞です。これは、“初めて出会ったガン細胞やウイルス感染細胞でも殺す”細胞という意味です。

一方、反復して出会ったガン細胞やウイルス感染細胞を攻撃するのはキラー T 細胞です。キラー T

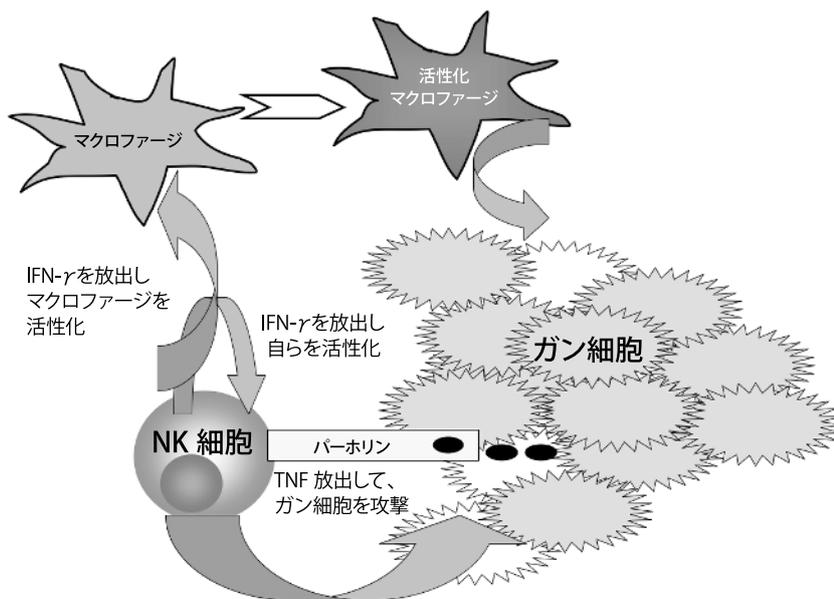


図 2-3 NK 細胞によるガン細胞の攻撃

細胞は、その機能を発揮するために胸線で厳しい教育を受け、記憶力や厳密な規律を習得した細胞です。

NK 細胞は免疫細胞としての厳しい教育を受けていないために、自分以外の細胞を識別することはできません。そのために、NK 細胞は何度出会っても自分と少しでも違うと攻撃をしかけます。このような NK 細胞の性質は、ガン化した細胞やインフルエンザウイルスに対しては、キラー T 細胞よりも良いところもあります。

例えば、毎年、風邪が流行する時期になると、今年の風邪はホンコン I 型とか、ロシア型とか報道されます。この報道は、風邪の原因となるインフルエンザウイルスが非常に変異し易いことによるものです。前年流行したインフルエンザウイルスに対するキラー T 細胞がいくら作られても、そのキラー T 細胞は今年のインフルエンザウイルスを攻撃できない可能性を伝える報道です。同様に、ガン細胞もその起源やガン化の原因が多様であり、以前に患ったガン細胞に対するキラー T 細胞が今回患っているガン細胞を攻撃できるとは限りません。そのために、インフルエンザウイルスやガン細胞に対しては、NK 細胞の方がキラー T 細胞よりも効果的な場合もあるのです。

人間社会の殺し屋は、ライフル銃やナイフなどの武器を持っています。NK 細胞もガン化した細胞やウイルス感染細胞を攻撃するための武器を持っています。図 2-3 に示したように、NK 細胞の武器はパー

ホリンと呼ばれる物質です。

パーホリンはガン細胞やウイルス感染細胞に穴を開け、その穴から細胞を攻撃する物質を注入して破壊します。NK 細胞は腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) を放出します。TNF はその名が示す通り、ガン細胞を直接攻撃するタンパク質です。NK 細胞は、インターフェロン γ (IFN- γ) を放出します。IFN- γ は、NK 細胞自らを活性化し、より多くのパーホリンや TNF を放出させるとともに、マクロファージを活性化して TNF を放出させます。

4) 獲得液性免疫の主役、抗体

液性免疫を担う物質には、リゾチーム、トランスフェリン、ラクトフェリン、IFN- γ 、抗体などの様々なタンパク質があります。それらのタンパク質は血液やリンパ液に溶けて全身を循環し、分泌液や臓器に入り込みます。

IFN- γ には、マクロファージの活性化を始めとして様々な免疫調節作用があります。リゾチームは、グラム陽性病原性細菌の細胞壁を溶かす酵素です。リゾチームに細胞壁の一部を溶かされた病原性細菌は、細胞のイオンバランスを失い死滅します。トランスフェリンとラクトフェリンは鉄イオンと結合し、病原性細菌の増殖に必要な鉄イオンの利用を妨害して、その増殖を抑えます。すなわち、これらのタンパク質は、いずれも不特定多種の病原性細菌を攻撃します。

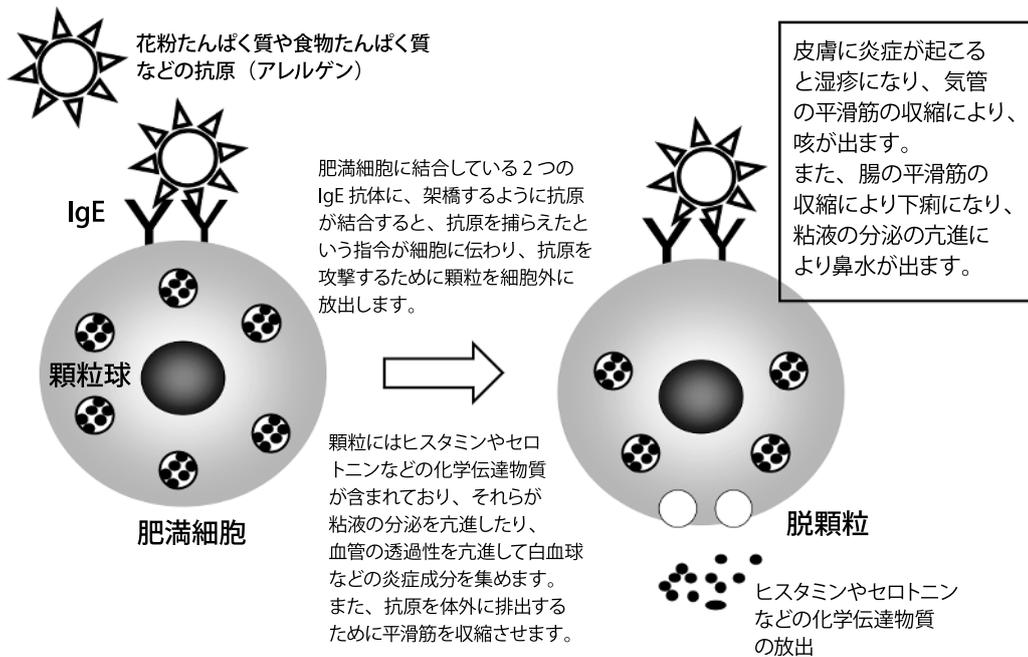


図2-4 I型アレルギー症状の起こるしくみ

一方、獲得液性免疫を担う物質は抗体です。抗体は、病原性微生物やガン細胞などの抗原と特異的に結合する機能と、それを破壊する系を活性化する機能を持つ免疫グロブリンと名付けられたタンパク質です。

ヒトの抗体は、抗原を破壊するために活性化する系の違いにより、5つのクラス (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD) に分かれます。各クラスの一つの抗体は1種類の抗原としか結合できません。そのために、抗体のクラスは5種類ですが、各クラスの抗体は抗原の種類と同じだけ種類があります。

抗体は、クラスにより、主として存在するところが違います。例えば、IgGは、血液に最も多く含まれ、全身を循環しています。一方、粘膜IgAは、消化器系や呼吸器系などの粘膜組織に多くある抗体です。そのために、IgGは全身免疫を担う抗体、粘膜IgAは局所免疫を担う抗体とされています。

すべての抗体が、健康維持に寄与しているとは限りません。例えば、IgEの生体防御における本来の役割は、寄生虫感染に対する防御とされています。ところが、最近、日本人に多い花粉症を初めとしたアナフィラキシーやアトピーなどのI型アレルギーの原因物質にはIgEがなっています。

農薬の普及や予防医学の発達により、寄生虫が腸管に侵入することが殆どなくなった私たち日本人では、IgEの仕事は減り、抗体の中では窓際族的存在

になりました。本来の仕事が与えられないIgEは、花粉タンパク質や蕎麦タンパク質が体内に侵入すると、時として、それらに対する抗体として大量に作られます。

図2-4に示したように、花粉タンパク質や蕎麦タンパク質と特異的に反応するように作られたIgEは、皮下や粘膜にある肥満細胞の表面や白血球の一つである好塩基球の表面のIgE受容体に結合します。春先に飛び交う花粉タンパク質は、鼻や口の粘膜の肥満細胞と結合しているIgEに、また、蕎麦タンパク質は消化器官の肥満細胞に結合しているIgEに結合します。すると、それらIgEと花粉や蕎麦タンパク質 (IgEと特異的に結合する抗原を“アレルゲン”と呼んでいます) の結合 (“抗原抗体反応”と言います) が刺激となり、肥満細胞や好塩基球はアレルゲンを攻撃するために、細胞内の顆粒球を細胞外に放出します。顆粒球には、ヒスタミンやセロトニンと呼ばれる化学情報伝達物質が含まれています。それらの物質は血管を拡張します。すると、血管から体液が滲み出して皮下に蕁麻疹が出来ます。また、化学情報伝達物質が鼻や口の中の平滑筋に作用すると、平滑筋は収縮し喘息の発作や吐き気が生じます。それが花粉症や蕎麦アレルギーの症状となるのです。

抗体は、獲得液性免疫の主役を担う物質です。疾病を予防するために、生物の長い進化の過程で合目

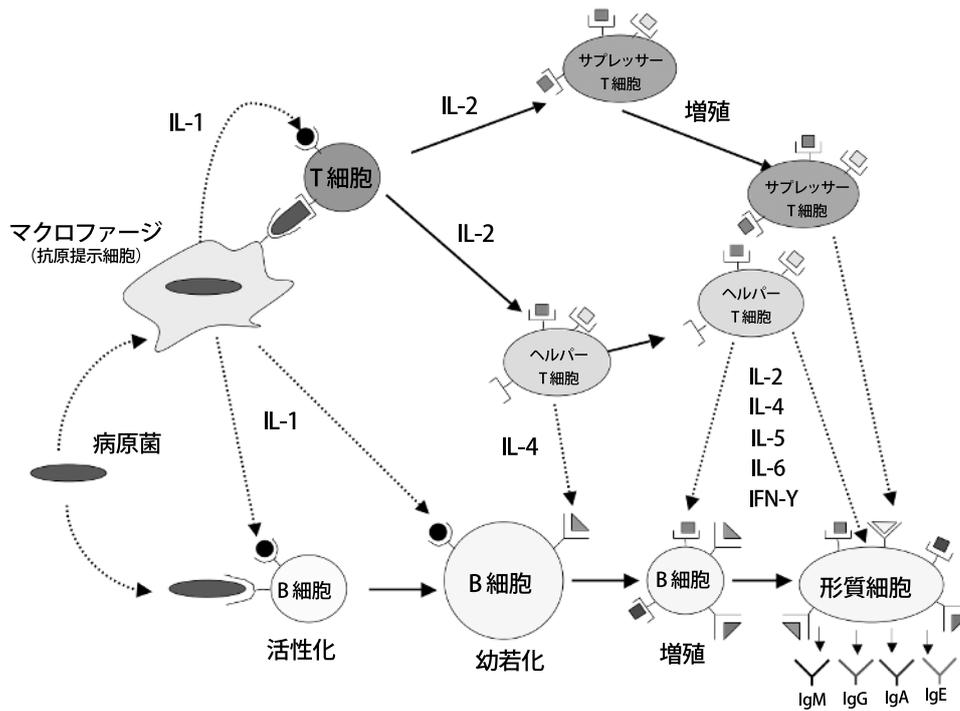


図 2-5 免疫細胞の相互作用による抗体産生の模式図

的に作られるようになりました。しかし、実際には、IgEのように疾病の原因になることもあります。このことは、私たちの生活が動物としての本来の進化の軌道から外れていることへの警鐘なのかも知れません。

(2) 感染防御やアレルギー予防を担う粘膜免疫

1) 全身免疫と粘膜免疫

免疫を担う細胞は、マクロファージや好中球のような食細胞やNK細胞などに加えてリンパ球があります。これらの免疫細胞のもとになる細胞(幹細胞)はすべて骨髄で作られます。骨髄で作られた幹細胞は、骨髄を始めとした様々な臓器でマクロファージやリンパ球などの成熟細胞になります。成熟した免疫細胞は脾臓やリンパ節を始めとした様々な組織に貯蔵され、血液やリンパ液によって体内を循環し、病原性微生物を始めとした抗原の無毒化を行います。

獲得免疫において、最も重要な役割を担う細胞がリンパ球です。リンパ球はBリンパ球(以後、B細胞と言います)とTリンパ球(以後、T細胞と言います)に分類されます。B細胞は、骨髄で作られた幹細胞が骨髄や肝臓などで成熟した細胞です。T細胞は、骨髄で作られた幹細胞が胸腺に移行し、そ

こでスパルタ教育を受けて最終試験に合格したエリート細胞です。胸腺でのスパルタ教育に耐えて合格する細胞は、胸腺に入学した細胞の5%以下と言われています。

B細胞の“B”は、bone marrow(骨髄)のBに由来し、T細胞の“T”は、thymus gland(胸腺)のTに由来します。B細胞は、抗体を産生する形質細胞に分化します。T細胞は、B細胞の増殖や形質細胞への分化や抗体クラスの設定などを行うサイトカインと呼ばれるタンパク質を生産します。また、獲得細胞性免疫の主役であるキラーT細胞の誘導を行います。

図 2-5 に、マクロファージ、T細胞およびB細胞の相互作用により、獲得液性免疫の主役である抗体が産生される模式図を示しました。

多くの病原性生物は傷口や粘膜から侵入します。腸管や気管を始めとした粘膜組織は、皮膚と同じように、様々な病原性生物と接する解放系の組織です。腸の面積は、皮膚の200倍以上であり、テニスコートの約1.5倍と言われています。粘膜組織の中でも腸管粘膜は全粘膜組織の80%以上を占め、多種多様な食物や病原性微生物が侵入するところです。しかし、腸管粘膜の構造は皮膚のように丈夫な構造ではありません。そのために腸管粘膜は粘液によって覆われています。腸管粘膜は食物を

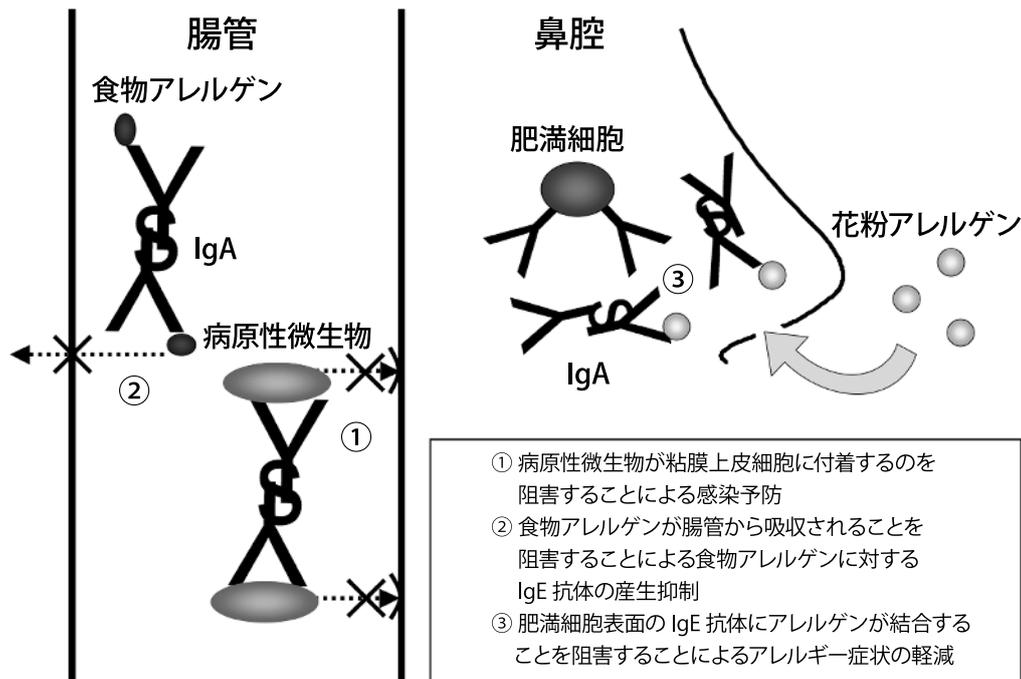


図 2-6 粘膜 IgA の機能

消化吸収するためだけではなく、免疫器官としても非常に重要です。

腸管の免疫機構は、血管や臓器内に侵入する病原性生物を除去する免疫機構とは異なり、特有のものであります。そのため傷口や血液を介して侵入する抗原に対する免疫系を全身免疫（末梢免疫ともいいます）と呼び、腸管や乳腺などの粘膜組織を介して侵入する抗原に対する免疫系を粘膜免疫（局所免疫）と呼んで区別をしています。粘膜免疫の中核器官は腸管です。ご飯、パン、牛乳・乳製品などの食品を食べたときに、それらの食品成分が直接接することができる可能性が最も高いのは腸管免疫組織です。

2) 腸管免疫の特長：経口免疫寛容と粘膜 IgA

侵入した微生物が私たちの体にとって無害か有害かとは関係なく、私たちは食物とともに、毎日無数の微生物を腸に取り込んでいます。また、食物には、私たちの体成分とは異なる膨大な種類と量の抗原が含まれます。しかし、私たちがほとんど感染症を患うことや、食品アレルギーに陥ることなく健康な生活を営めるのは、腸管に備わっている腸管特有の免疫応答によります。

腸管に特有の免疫応答の1つは、食物として腸に

取り込んだタンパク質に対する IgG や IgE は産生され難いことです。口から摂取した抗原に対する抗体応答が生じにくい現象を、“経口免疫寛容”と呼んでいます。

経口免疫寛容が生じる要因は、①抗体の産生に参与する T 細胞が毎日多量の同じ抗原と接することにより麻痺して働かなくなること、②抗体産生を停止させる指令を下すサブプレッサー T 細胞が多量に産生されること、③常に特定の抗原と接しているとその抗原に特異的な T 細胞が除去されること、などの T 細胞の機能と関連付けられています。

一方、腸管では IgG や IgE が産生され難いのは対照的に、粘膜 IgA は優先的に産生されます。図 2-6 に示したように、腸の粘膜 IgA は、タンパク質や病原性微生物と結合してもそれを破壊することなく、糞便として体外に排泄します。粘膜 IgA が腸で抗原の破壊処理を行わないことは、腸管上皮細胞に炎症を起こさないという利点があります。腸管上皮細胞が炎症により傷つくと、感染症を起こしやすくなり、また、食品アレルギーの原因物質が腸から容易に吸収されてアレルギーを患いやすくなります。腸管の主要抗体が粘膜 IgA であることは生命維持にとって非常に合目的なことなのです。

腸管免疫系の模式図を図 2-7 に示しました。腸に

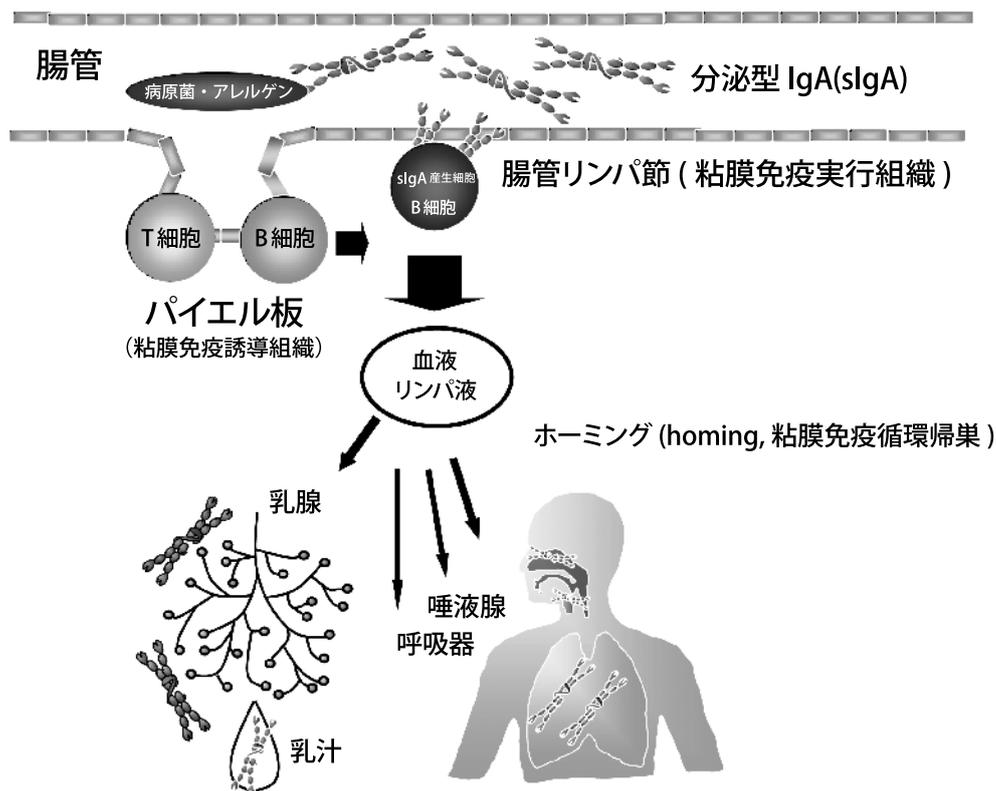


図 2-7 腸管粘膜免疫系の模式図

侵入した病原性微生物は、パイエル板表面の M 細胞を通して、パイエル板内に取り込まれます。パイエル板内の病原性微生物は、樹状細胞（前述したマクロファージと同じ機能を持つ細胞です）により貪食され、その断片がパイエル板内の T 細胞に提示されます。同時に、パイエル板内の B 細胞もその病原性微生物を認識し、T 細胞の生産するサイトカインの作用を受けて、細胞膜表面に病原性微生物と特異的に反応する IgA を発現し、sIgA+B 細胞（粘膜 IgA 分泌前駆細胞）に分化します。

分化した前駆細胞は、パイエル板を放れて腸間膜リンパ節を経て粘膜固有層に移行し、パイエル板内で認識した（免疫用語では、“感作された”と言います）病原性微生物と反応する粘膜 IgA を産生します。また、その IgA 産生前駆細胞は、循環帰巢経路（ホーミング）により、リンパ管や血管を介して鼻腔、咽頭、気管支、涙腺、唾液腺および乳腺などに運ばれ、それらの粘膜組織においてパイエル板で認識した病原性微生物と反応する粘膜 IgA を産生します。産生された粘膜 IgA はその場所で感染防御に寄与します。

3) アレルギーの予防も行う粘膜 IgA

最近、わが国では花粉症を始めとした I 型アレルギー患者が増加し、I 型アレルギーは大きな社会問題になっています。花粉症や蕎麦アレルギーなどの I 型アレルギーの発症機構を、既に前項で述べました。

I 型アレルギーの予防や治療には、① IgE の産生抑制、② 肥満細胞に結合した IgE へのアレルゲンの結合抑制、③ アレルゲンと IgE の結合後に生じる脱顆粒の抑制、④ 脱顆粒により肥満細胞から放出されるヒスタミンやセロトニンなどの化学情報伝達物質の中和などが考えられます。

腸の粘膜 IgA は食品アレルゲンと結合し、糞便としてアレルゲンを体外に排泄します。そのために、腸管からアレルゲンが吸収されることが阻害され、IgE 産生が抑制されます。合わせて、粘膜 IgA は、IgE と同じ場所に存在しており、アレルゲンが粘膜 IgA と結合すると肥満細胞上の IgE と結合できなくなります。これらの作用により、粘膜 IgA は、I 型アレルギーの予防や軽減に寄与しています。

2. 生体防御機能の探索法

免疫には、体内で生じたガン細胞や外から侵入する病原性微生物などの抗原を無差別に排除する自然

表 2-1 ヒトにおいて確認されている Toll 様受容体 (TLR) とそれらが認識する分子

種類	認識する分子 (リガンド)
TLR1	トリアシルリポタンパク質
TLR2	リポタンパク質, ペプチドグリカン, リポテイコ酸, 真菌の多糖ウイルスの糖タンパク質
TLR3	二本鎖 RNA (一部のウイルスに含まれる), ポリ I:C (合成核酸)
TLR4	リポ多糖, ウイルスの糖タンパク質
TLR5	フラジェリン
TLR6	ジアシルリポタンパク質
TLR7	合成低分子化合物 (抗ウイルス剤イミダゾキノリンなど), 一本鎖 RNA
TLR8	合成低分子化合物, 一本鎖 RNA
TLR9	非メチル化 CpG DNA
TLR10	不明

(フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』,
<http://ja.wikipedia.org/wiki>, 2007 年 12 月 25 日更新版)

免疫と、過去に遭遇したことのある抗原を特異的に認識して排除する獲得免疫があることを、既に述べました。

以前は、自然免疫は下等動物に備わった原始的な免疫であり、獲得免疫とは独立しているものと考えられていました。ところが、免疫細胞の表面に存在する病原性微生物の成分と特異的に結合する Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) の研究が進み、自然免疫と獲得免疫はそれぞれが独立したものではなく、密接な関係にあり、前者は後者が成立するために不可欠なものと考えられるようになりました。

例えば、自然免疫では、病原性微生物にある特有の分子構造を Toll 様受容体が認識し、IRAK-4 と呼ばれるセリン・スレオニンリン酸化酵素を介して、生体防御のための情報伝達が行われます。獲得免疫は、抗原提示細胞に提示された抗原を T 細胞が認識することから始まりますが、この T 細胞応答においても IRAK-4 を介した情報伝達は不可欠です。

一方、免疫は、それに関与する物質により細胞性免疫と液性免疫に大別されます。細胞性免疫および液性免疫は、それぞれヘルパー T 細胞のサブセットである I 型ヘルパー T (Th1) 細胞と II 型ヘルパー T (Th2) 細胞により調節されています。花粉症で代表される I 型アレルギーは、特定の抗原に対する IgE クラスの抗体が過剰に産生されることにより起こります。抗体は本来、獲得液性免疫の主役です。そのために、I 型アレルギーは、Th1/Th2 細胞バランスの不均衡に起因すると考えられています。したがって、Toll 様受容体の発現状態を解析することや、Th1/Th2 細胞バランスを調べることにより、免疫系

を介した生体防御機能についての知見を得ることが出来ます。

本項では、生体防御機能の中でも、Toll 様受容体を介した免疫調節作用、Th1/Th2 細胞バランスの調節作用および粘膜 IgA 産生促進作用の検索法を紹介します。

(1) Toll 様受容体を介した免疫調節作用

1) 免疫系における Toll 様受容体の役割

これまでに、一度も侵入したことがない病原性微生物が体内に侵入すると、ラクトフェリンやリゾチームのような抗菌性物質、食細胞、NK 細胞などの自然免疫に関係する物質による攻撃を受けます。食細胞であるマクロファージや樹状細胞には Toll 様受容体があり、その受容体に病原性微生物やウイルスが結合することにより、無毒化機構が活性化されます。

Toll 様受容体は、カブトガニからヒトまで、多くの生物で複数種存在することが明らかにされています。それらは、TLR に数字を付けて区別されています。

Toll 様受容体の中でも、TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 および TLR9 の 8 種を魚からヒトまでが持っています。マウスには、TLR10 が無く、代わりに、TLR11, TLR12 および TLR13 があります。また、ニワトリには、TLR1 が 2 種類と TLR2 が 2 種類あります。表 2-1 にヒトの Toll 様受容体の種類とそれらが認識している微生物成分 (リガンドと言っています) を示しました。これらの Toll 様受容体と結合する病原性微生物の成

分は、長い生物の進化過程においても保存されて来ました。しかし、それらのリガンドはヒトにはありません。

免疫細胞の Toll 様受容体に病原性微生物やその成分が結合すると、免疫細胞の細胞内シグナル伝達経路を介して、転写因子であるインターフェロン制御因子 (IRF) と核内因子 κ B (NF- κ B) が活性化されます。その活性化により、IFN- α , IFN- β , インターロイキン (IL) -1, IL-6, IL-8 などの炎症に関わるサイトカインの遺伝子が誘導されます。誘導された遺伝子により作られたサイトカインを介した免疫反

応により病原性微生物は無毒化され、ヒト (動物) は発症から免れます。

2) Toll 様受容体を介した免疫調節作用の確認方法

免疫系は表 2-2 に示したように、様々なサイトカインにより調節されています。したがって、Toll 様受容体を介すること、介さないこととは関係なく、母乳存在下と非存在下での種々のサイトカイン量を比較することにより、母乳が免疫系にどのような影響を及ぼすかを予測することができます。

サイトカインの定量は一般に、サイトカインの

表 2-2 主要サイトカインとその性質

サイトカイン	産生細胞	性質
IFN- γ	Th1 細胞, CD8 ⁺ T 細胞, 単球・マクロファージ, 樹状細胞, NK 細胞, NKT 細胞	Th0 から Th1 への分化促進。Th2 細胞の増殖抑制。単球・マクロファージの活性化, 貪食能と NO 産生促進。MHC クラス II 分子発現促進。キラー T 細胞誘導。NK 活性促進。抗ウイルス作用。好中球活性化
IL-1 β	単球・マクロファージ, B 細胞	B 細胞の活性化と抗体産生の促進。単球, マクロファージに作用して TNF- α , IL-1, IL-6 および IL-8 の産生誘導。PGE2 の産生亢進
IL-2	Th1 細胞, NK 細胞, キラー T 細胞	キラー T 細胞およびヘルパー T 細胞の増殖, 活性化。NK 細胞の増殖, 分化, 活性化。単球・マクロファージの活性化
IL-4	Th2 細胞, CD8 ⁺ T 細胞, 肥満細胞, 好塩基球, NKT 細胞	Th2 細胞の増殖, 分化促進。活性化 B 細胞に作用して IgM から IgG1 および IgE へのクラススイッチ促進。IgG1 および IgE 産生の促進
IL-5	Th2 細胞, NK 細胞, 肥満細胞, 好酸球	B 細胞の活性化, 増殖, 分化を促進。IgA 産生に必須。好酸球の成熟と分化の促進
IL-6	T 細胞, B 細胞, 単球・マクロファージ	IgA 産生形質細胞への分化を促進し, IgG, IgM および IgA の産生促進。T 細胞の分化と活性化
IL-10	Th2 細胞, 単球・マクロファージ, 活性化 B 細胞, 肥満細胞	Th1 細胞による INF- γ の産生抑制。マクロファージによる IL-1, IL-6, IL-12, および TNF- α の産生の抑制。マクロファージによる T 細胞活性化補助機能の抑制。T 細胞の MHC クラス II 分子や補助受容体の発現。マクロファージの CD80/CD86 発現抑制
IL-12	活性化マクロファージ, 樹状細胞, B 細胞	IFN- γ 誘導因子。Th0 から Th1 への分化促進。NK 細胞の活性化, 増殖促進
IL-13	活性化 CD4 ⁺ T 細胞	抗 IgM 抗体あるいは CD40 存在下で B 細胞の増殖促進。IgE 産生細胞へのクラススイッチ誘導。単球による IL-1, IL-6, IL-8 および TNF- α の産生抑制。NK 細胞による IFN- γ の産生促進
IL-18	樹状細胞, 活性化マクロファージ	アレルギー性疾患 (IgE 産生, アレルギー性炎症) の発症に関与。IL-12 存在下では IFN- γ の産生促進 (Th1 誘導)。T 細胞による Th2 型サイトカインの産生誘導
TNF- α	マクロファージ, T 細胞, B 細胞, NK 細胞, 好中球, 肥満細胞	炎症性サイトカイン。腫瘍壊死。マクロファージおよび NK 細胞の活性化。T 細胞と B 細胞増殖促進。好中球の活性化。細胞接着因子の発現促進
TGF- β	T 細胞, B 細胞, マクロファージ	抗炎症性サイトカイン。T 細胞と B 細胞の増殖・分化抑制。NK 細胞の活性化の抑制。IgA クラススイッチ。単球による TNF- α と IFN- γ の産生抑制

mRNA 発現量の測定, サイトカイン生産細胞数の測定, 分泌されたサイトカイン量の測定により行われます。

a. 定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法

サイトカインの mRNA 発現量はリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法と、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法の組み合わせによる定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 RT-PCR) 法により測定できます。リアルタイム PCR は、DNA 増幅装置 (サーマルサイクラー) と分光蛍光光度計を一体化した装置で行います。この装置により PCR 増幅産物の蛍光を経時的、すなわちリアルタイムに検出することができ、その増幅率に基づいて鋳型となる DNA の定量が行えます。

一般に、増幅産物の検出には、インターカレーターを用いる方法と、蛍光標識プローブを用いる方法があります。インターカレーター法は、二本鎖 DNA をすべて検出するために、遺伝子ごとにプローブを準備する必要がなく、実験コストが安く、反応系の構築が容易であるという長所があります。しかし、検出するサイトカインの特異性が低いのが短所です。

一方、蛍光標識プローブを用いる方法は、実験コストは高いが、特異性が高く、相同性の高い配列のサイトカインでも区別して検出できるところが長所です。

なお、表 2-3 に PCR で測定する各種サイトカインのプライマーの塩基配列を示しました。

b. フローサイトメトリー法

サイトカインを生産する細胞数は、フローサイトメーターで測定できます。フローサイトメーターによる定量は、原理的には単細胞や細胞混合物を Phycoerythrin(PE), Fluorescein isothiocyanate(FITC), Cy-chrome, ビオチンなどの蛍光物質を標識したサイトカインや膜タンパク質分子 (細胞表面抗原と言います) に特異的な抗体で染色し、蛍光物質の強度により求めます。

すなわち、まず、調製した細胞浮遊液に蛍光物質を標識した目的のサイトカインに対する抗体を加えて反応させます。未反応の抗体を除去した後、細胞を一例に並べて、レーザービームをあてると蛍光が放出されます。その蛍光強度の強さから、サイトカイン生産細胞数が算出できます。

また、試験細胞浮遊液に、目的のサイトカインを生産する細胞が複数種存在する場合は、サイトカインに対する抗体に標識した蛍光物質とは異なる波長で蛍光を発する物質を標識した特定の細胞表面抗原に対する抗体と反応させることにより、目的としたサイトカインを生産する特定の細胞数を求めることができます。

なお、表 2-4 に、免疫細胞の同定のための主要免疫細胞に発現している細胞表面抗原を示しました。

表 2-3 免疫系に関するマウス主要サイトカインのプライマーの塩基配列

サイトカイン	配列
IFN-γ	GTC AGC CGC TTG GCT GTC CCC GAG GAA CTG GCA AAA GGA TGG
IL-1β	TGT CTT TCC CGT GGA CCT TCC CCT GAC CAC TGT TGT TTC CCA GG
IL-2	TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G GCC CTT GGG GCT TAC AAA AAG
IL-4	CAT CGG CAT TTT GAA CGA GGT CA CTT ATG GAT GAA TCC AGG CAT CG
IL-5	CTC ACC GAG CTC TGT TGA CAA G GAA CTC TTG CAG GTA ATC CAG G
IL-6	CTG GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT A ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T
IL-10	CCC TGC AGC TCT CAA GTG TGG GCT GAA GAC CCT CAG GAT GCG
IL-12 p40	GAG GTG GAC TGG ACT CCC GA CAA GTT CTT GGG CGG GTC TG
IL-13	CTG AGA CCC TGA GCA CTA GGC CTC CCT CTG ACC CTT AAG GAG C
IL-18	GAC CTG GTG GGG GTT CTC TGT GTG TCC TGG AAC ACG TTT CTG
TNF-α	GCG GTG CCT ATG TCT CAG CCT CAG AGT AAA GGG GTC AGA GTG
TGF-β	CCC TGG TGG TAT ACT GAG ACA CC CGG GTG CTG TTG TAC AAA GCG AG

表 2-4 主要免疫担当細胞に発現している細胞表面抗原とその性質

細胞表面抗原	発現細胞	性質
CD3	成熟 T 細胞	静止期の T 細胞および活性化 T 細胞に発現
CD4	ヘルパー T 細胞	MHC-II のレセプター, IL-16 のレセプター
CD8	キラー T 細胞、 サブレッサー T 細胞	MHC-I のレセプター
CD11b	マクロファージ	全てのマクロファージに発現
CD11c	樹状細胞	全ての樹状細胞に発現
CD14	マクロファージ	LPS レセプター
CD16a	NK 細胞, マクロファージ	FcγR II A, 免疫複合体に対する低親和性レセプター
CD16b	顆粒球	FcγR III B, 免疫複合体に対する低親和性レセプター
CD19	B 細胞 (形質細胞を除く)	B 細胞の分化の指標, 増殖および活性化に関与
CD23	B 細胞	FcεR II, IgE に対する低親和性レセプター
CD25	Treg (CD4 と組み 合わせて)	IL-2 レセプターの α 鎖, 活性化 CD8 ⁺ T 細胞, 樹状細胞および B 細胞にも発現
CD28	T 細胞	CD80 と CD86 のリガンド
CD32	マクロファージ, B 細胞, 肥満細胞	FcγR II, 凝集 IgG および IgG 複合体に対する高親和性レセプター
CD40	B 細胞全般	B 細胞の増殖, 抗体産生のシグナル
CD49b	NK 細胞	NK 細胞の同定に使用
CD64	マクロファージ, 樹状細胞	FcγR I, Monomeric IgG に対する高親和性レセプター
CD80(B7)	マクロファージ, 樹状細胞	CD86 と同様に T 細胞の活性化に必要
CD83	成熟樹状細胞	抗原提示能が強い活性化樹状細胞で発現
CD86	マクロファージ, 樹状細胞	CD80 同様に T 細胞の活性化に必要
CD90	T 細胞	全ての T 細胞に発現
CD138	形質細胞	ナイーブ B 細胞やメモリー B 細胞には存在しません

c. 酵素免疫測定法

前述したサイトカインの定量法は、サイトカインを作る遺伝子やサイトカインを生産する細胞を測定するもので、生産されたサイトカインそのものを測定する方法ではありません。サイトカインそのものの定量は、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) により行うことができます。

ELISA ではまず、サイトカインに対する抗体 (一次抗体と言います) をマイクロプレートのウエルに入れて固定します。次いで、サイトカインを含む試験液を固定した一次抗体に加えて、抗原抗体複合物を作ります。続いて、酵素標識をしたサイトカインに対する抗体 (二次抗体と言います) を、そのマイクロプレートのウエルに入れ、放置します。このことにより、一次抗体とサイトカインの抗原抗体複合物に二次抗体が結合します。抗原抗体複合物に結合しなかった二次抗体を洗浄により除去し、二次抗体

に標識した酵素の基質をウエルに入れ、一定時間放置します。このことにより、二次抗体に標識した酵素が基質に作用して、発色物質や蛍光物質ができます。その発色物質や蛍光物質を分光光度計や蛍光光度計で定量することにより、サイトカインの量を算出します。

ELISA による測定は、サイトカインそのものを測定することから、PCR 法やフローサイトメトリー法と比べて、サイトカインの定量法としては、信頼性がより高い方法です。各サイトカインに特異的な定量用 ELISA キットが市販されています。それを用いることにより、容易に目的とするサイトカインの定量ができます。

サイトカインの定量は、免疫系の変動の指標となりますが、必ずしも Toll 様受容体を介した変動を反映するとは限りません。Toll 様受容体を介した変動であることを明らかにするためには、細胞内シグナル伝達経路を介した転写因子である IRF や NF-

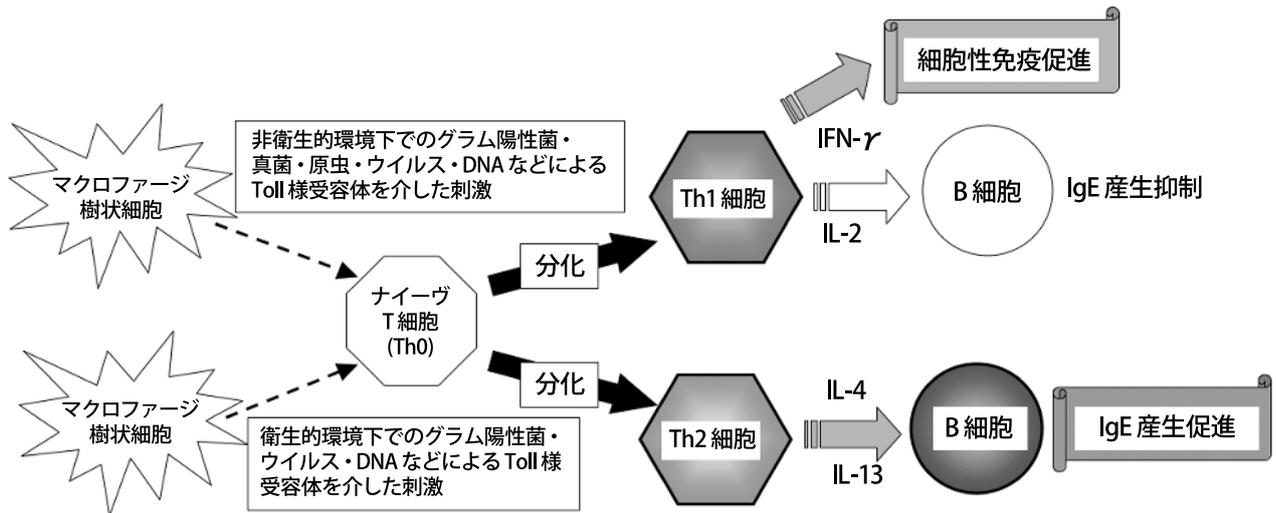


図 2-8 Th1 細胞および Th2 細胞による IgE 産生の調節

κ B が活性化され、さらに下流のシグナル伝達経路も活性化されることを確認する必要があります。また、対象とする Toll 様受容体を発現しないノックアウトマウスを用いた実験により確認することも重要です。

(2) Th1/Th2 細胞バランスの改善作用

1) Th1/Th2 細胞バランスとアレルギー

ヘルパー T 細胞は種々のサイトカインを生産しますが、生産するサイトカインの種類により、サブグループに分かれます。

Th1 細胞は細胞性免疫に深く関係し、Th2 細胞は獲得液性免疫に関係します。これら Th1 細胞と Th2 細胞は、ともにマクロファージや樹状細胞の作用により、ナイーブ T 細胞から分化した細胞です。図 2-8 に示したように、どのサブグループに分化するかは、病原性微生物やその構成分子がどの Toll 様受容体に結合したかにより決まります。

Th1 細胞は、マクロファージの活性化や細胞傷害性 T 細胞の誘導などの細胞性免疫に必要な IL-2、IFN- γ および TNF- α を生産します。一方、Th2 細胞は抗体産生に必要な IL-4、IL-5 および IL-6 を生産します。ナイーブ T 細胞は IL-12 と IFN- γ の作用を受けると Th1 細胞への分化が促され、IL-4 の作用を受けると Th2 細胞への分化が促されます。また、IL-4 および IL-13 の作用を受けると Th1 細胞への分化が抑制され、IFN- γ の作用を受けると Th2 細胞への分化が抑制されます。

Th1/Th2 細胞バランスの偏向は、様々な免疫疾患の原因になります。例えば、Th1 細胞が優位になり過ぎると炎症性疾患や自己免疫性疾患を患いやすくなり、Th2 細胞が優位になり過ぎるとアレルギー性疾患や潰瘍性大腸炎を患いやすくなります。

最近、花粉症を始めとした I 型アレルギー患者が激増していることと、Th1/Th2 細胞バランスを関連付けて、次のように考える研究者がいます。

「お母さんのお腹の中の胎児は、Th2 細胞優位のために、出生時は Th2 細胞優位です。しかし、病原性の有無に関わらず、腸管内に生息する様々な微生物に誕生初期に暴露されると、Th2 細胞優位から Th1 細胞優位へと移行します。ところが、清潔志向が強すぎるあまり、出生後の初期の段階で感染症を患わなくなり、Th2 細胞優位の状態が持続します。それが、アレルギーを患い易くなった要因です。」このような考えは、アレルギーの“衛生仮説”と言われています。

Th2 細胞により生産された IL-4 と IL-13 は、B 細胞が分化した形質細胞による IgE 産生を促し、IL-5 は好酸球の分化を促進します。そのために、Th2 細胞優位になると IgE の過剰産生と好酸球の過剰亢進となり、アレルギー反応が惹起されます。そこに、Th2 細胞から過剰に生産された IL-4 と IL-13 の作用により、Th1 細胞への分化が抑制され、Th2 細胞への分化が一層促されます。それにより、アレルギー症状は一層激しくなります。

一方、最近では、誕生初期の感染症だけでは、ア

アレルギー患者の激増の説明にはならないという考えがあります。そのような考えの研究者は、制御性T細胞である Th3 (Treg) 細胞の生産する IL-10 や TGF-β の重要性を指摘しています。しかし、いずれにしても、アレルギーの発症と腸管の微生物との関連性は深いものと思われま

2) Th1/Th2 細胞バランスの確認方法

Th1/Th2 細胞バランスは、ELISA による Th1 細胞の生産するサイトカイン (Th1 型サイトカイン) と Th2 細胞の生産するサイトカイン (Th2 型サイトカイン) の定量、定量 RT-PCR 法による T 細胞サブグ

グループに特異的な細胞表面抗原遺伝子やサイトカイン遺伝子の発現レベルの解析、フローサイトメーターによる T 細胞サブグループに特異的な細胞表面抗原を持つ細胞数の測定などにより、確認できます。

(3) 粘膜 IgA 産生促進作用

粘膜 IgA の役割は前項で述べた通りです。粘膜 IgA の定量は、ELISA による直接定量、定量 RT-PCR 法による遺伝子レベルでの発現解析、フローサイトメーターによる産生細胞数の測定を行うことによりできます。

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、品揃えしております。

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 –3

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2} 吉野 精一 (YOSHINO Seiichi)³

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–3」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。

3-2. 穀物の毒性

1950 年にディッケの論文で始まった初期の調査では、小麦、ライ麦、大麦は CD 患者に有害であるが、米とトウモロコシは有害ではなかったことが示された³⁶⁾。ソバやジャガイモなどのイネ科以外の植物は安全であると見なされていた。当時は腸の生検の技術が利用できなかったため、研究は摂食試験とその後の症状と脂肪またはキシロースの吸収不良の出現に依存していた。その後、腸の生検と免疫原性反応に関する組織学的研究が毒性判断に使用された。オートムギの毒性についてはまだ意見の相違があり、小麦とオートムギだけは広く研究されており、小麦の疑いのない毒性をもたらしている（以下の議論を参照）。ライムギと大麦のテストはかなり最小限だったが、貯蔵タンパク質の構造から推測され

る小麦との強い類似性は、CD の毒性を裏付けている。トウモロコシ、イネ、モロコシ、キビ、およびすべての非穀物植物が安全であると見なされるようになった。これは、おそらくこれらの作物を含む食事からの矛盾する証拠が何十年も遭遇していないからである。小麦を含まないモロコシ食品の安全性は、*in vitro* および *in vivo* 試験、ならびにゲノム、生化学、および免疫化学分析^{77,78)} によって確認された。

Kasarda によると、植物の分類法は、植物を安全または危険として分類するのに役立つガイダンスを提供するかもしれない^{79,80)}。間違いなく有毒な穀物（小麦、ライムギ、大麦）はすべて、イネ科 (Family) 内の単一の族 (Tribe), *Triticeae* で見つかる (図 2.2)。この植物関係および類似のタンパク質パターン^{81,82)} により、CD 患者はすべての小麦種、ライコムギ、

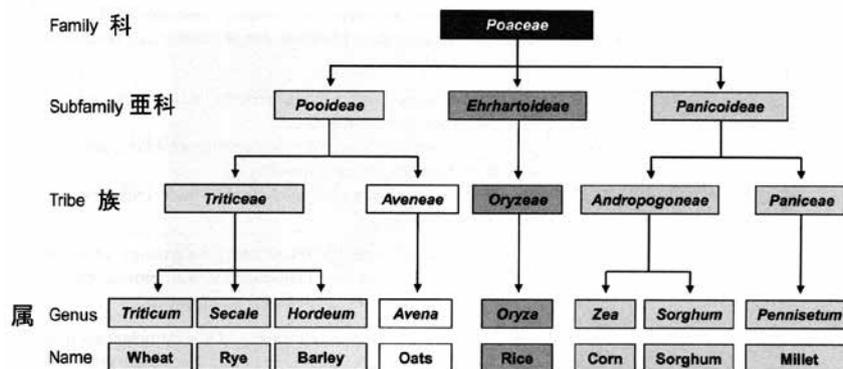


図 2.2 単子葉植物イネ科に属する穀物の系統

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会前会長, ³ 辻調理専門学校

およびライムギとオオムギのすべての植物形態を避ける必要がある。毒性に関して議論の余地があると判断されたオートムギは、同じ亜科 (Subfamily) *Pooideae* に属しているが、別の族 (Tribe) *Aveneae* に属している。すべての非毒性の一般的な穀物 (イネ、トウモロコシ、ソルガム、ヒエ) およびほとんど使用されない穀物 (テフ、ラギ、ジュズダマ) は、コムギ科からより離れており、イネ科 (Family) 内で別々の進化系統を示す。例えばソバ、アマランス、キノアなど、イネ科 (Family) 以外の種子は安全であると考えられている。四倍体 (デュラム, エンマー) および二倍体 (インコーン) 小麦種は、D ゲノムが存在しないため、六倍体 (コモン, スペルト) 小麦よりも CD 患者に有毒なタンパク質エピトープが少ないことが提案された⁸³⁾。実際、グルテンタンパク質の成分は少ない。しかし、小麦粉中のタンパク質量はさらに多く、すべてのグルテンタンパク質タイプは存在する⁸²⁾。さらに、 α -グリアジンの N 末端配列決定は、異なる小麦種の間で高度の一致を示した⁸⁴⁾。それにもかかわらず、刺激性エピトープのレベルに違いが存在する可能性がある。Molberg と共同研究者は、免疫原性 33-mer ペプチドと同一または同等のタンパク質断片が小麦染色体 6D 上の α -グリアジン遺伝子によってコードされているため、二倍体インコーン (ゲノム AA) および四倍体デュラム小麦 (ゲノム AABB) のグルテンが存在しない事を見出した⁸⁵⁾。*Triticum monococcum* グリアジンの毒性の欠如は、*in vitro organ culture system* でもまた示された⁸⁶⁾。しかし、グルテン感受性 T 細胞および器官培養試験に基づく他の発見は、古代小麦種の CD 毒性の証拠を提供した^{49, 87)}。

オートムギを GFD に組み込むと、高繊維、ビタミン B、マグネシウム、亜鉛、鉄の含有量、嗜好性の向上、心血管の健康に対する有益な効果が得られる可能性がある⁸⁸⁾。ただし、CD 患者の食事からオートムギを除外する必要性については議論の余地がある。Sontag-Strohm⁸⁹⁾ および Pawloska⁹⁰⁾ のグループは、チャレンジした個体数、毎日与えられたオートムギの量、チャレンジの期間、および臨床測定を含む毒性試験の概要を提示した。1953 ~ 1976 年のオートムギに関する報告は、オートムギ *in vivo* チャレンジ後の異なる効果を明らかにした；効果は、吸収不良試験で示されるように有害であり、腸生検で

示されるように無害であった。ただし、これらの研究は少数の患者に基づいており、チャレンジ期間は短かったため、オートムギのサンプルは小麦、ライムギ、または大麦の混入についてテストされていなかった。その後の研究はより包括的であり、より多くの患者が純粋であることが証明されたオートムギに挑戦された。最大 92 人の CD 患者とコントロールを含むさまざまなコホートに、3 ~ 60 か月間の 1 日あたり 10 ~ 93g のオートムギがチャレンジされた。使用された検査と測定の種類は、主に組織学的判断と血清学的検査を伴う十二指腸生検だった。結果は、オートムギは臨床的に許容され、組織学的損傷も細胞性または体液性免疫応答の誘発も引き起こさないことを明らかにした。それぞれ 1 ~ 5 年にわたる長期の研究で、患者が有害な影響なしにオートムギに耐えることを実証した^{91, 92)}。別の研究では、CD を患う子供は GFD で 2 年間にわたってオートムギに耐性があり、その間定期的に監視されていたと述べている⁹³⁾。同様の発見は、もう一つのグルテン関連障害である疱疹状皮膚炎の患者でも行われた^{94, 95)}。しかし、2 つの研究は、少数の患者に対するオートムギの有害な影響を示した^{96, 97)}。オートムギに敏感なケースの数が限られているため、このサブグループのサイズの数字による推定値は入手できない。最も可能性が高いのは、このサブグループが CD 患者の 1% 未満を構成している可能性があることだ⁹⁸⁾。主に良好な臨床的証拠にもかかわらず、オートムギが GFD に含まれることは継続的に議論されてきた。オートムギのプロラミン画分であるアベニンの含有量が比較的低いことは、ほとんどの患者にとって明らかな安全性を説明していると主張された。その後、オートムギ粉から分離された純粋なアベニンによる試験が実施された。繰り返すが、明確な結果は得られなかった。たとえば、T 細胞試験では、小麦 (グリアジン)、ライムギ (セカリン)、および大麦 (ホルデイン) のプロラミン画分に相当する免疫応答は示されたが、器官培養試験では陰性だった^{51, 52, 99)}。

結論として、臨床研究では、CD 患者に対するオートムギの一般的な無害性を支持する限られた結果しか得られない。オートムギを継続的に摂取する人 (子供には 20 ~ 25g/日、大人には 50 ~ 70g/日) は適切な臨床フォローアップ¹⁰⁰⁾ の必要性が推奨されて

いる。さらに、オートムギ製品は、小麦、ライムギ、または大麦の汚染についてテストする必要がある。これは、市販のオートムギの供給がこれらの穀物でひどく汚染されている可能性があるためである¹⁰¹⁾。いくつかの研究グループは現在、CDに毒性のないオートムギ品種の選択の基礎として、オートムギの潜在的な免疫原性の多様性を研究している。オートムギ品種間の2つの既知の免疫原性アベニンエピトープの違いは、すべてのCD患者にとって完全に安全なオートムギ品種の選択と育種が現実的な可能性があることを示している¹⁰²⁾。CD患者から分離されたT細胞に関する研究は、オートムギ品種は、非免疫原性、中程度の免疫原性、または高度な免疫原性のいずれかで、異なる免疫原性を持つ可能性があることを示した⁴⁸⁾。免疫原性の程度は、特定のグルタミンおよびプロリンが豊富なペプチドの存在に関連していた¹⁰³⁾。しかし、13の2倍体、4倍体、および6倍体オートムギ種のアベニン遺伝子の評価により、すべてが2つのCD特異的アベニンエピトープを含むことが明らかになった¹⁰⁴⁾。著者らは、これらのエピトープを欠くオートムギ品種が見つかる可能性は非常に低いと結論付けた。

3-3. タンパク質画分の毒性

初期の調査により、小麦、ライムギ、大麦、そして場合によってはオートムギはCD患者に有害であるが、トウモロコシ、米、ソルガム、およびキビは無害という結論に至った。有毒穀物の中では、最初から小麦タンパク質に、そしてその後オートムギタンパク質に調査が集中した。初期の研究者は、脂肪便などの症状の発生とキシロースまたは脂肪の吸収不良の測定に基づいた摂食試験を使用して毒性を確立した³⁶⁾。Dickeのグループの先駆的な研究により、水溶性画分(アルブミン)ではなく、小麦粉生地のゴム様タンパク質画分であるグルテンが毒性因子を負った¹⁰⁵⁾。小麦グルテンの分別により、アルコール可溶性グリアジン画分が最も毒性の高い因子であるという結論に至ったが、不溶性グルテニン画分の効果は、グリアジン画分と同様に、非毒性、弱毒性、または毒性のいずれかとして議論された。グルテニン画分は一般に、鎖間ジスルフィド結合を介してグルテニン凝集体に共有結合している奇数のシステインを有する修飾 ω -、 α -、および γ -グリアジンに

よってコンタミされていることに言及する必要がある^{106,107)}。したがって、グルテニンの毒性に関する記述は、グルテニン画分全体に関する研究ではなく、精製されたグルテニンサブユニットに基づいてすべきである。グリアジン画分または小麦グルテンのいずれかを使用して、さらに基本的な研究を実施した。重要な結果には以下が含まれる³⁶⁾：グリアジンの加熱と酸化によるジスルフィド結合の切断は毒性を減少させなかった。結果として、グリアジンの三次元構造は、その毒性効果にとって重要ではない。対照的に、酸加水分解によるグリアジンのアミノ酸への完全な分解は、それらを無害にした。グルタミンは、最も頻繁に貯蔵タンパク質中にあるアミノ酸であるが、CD患者に寛容される。ペプチド結合の限られた切断を伴う希釈塩酸によるグルタミン側鎖のグルタミン酸側鎖への広範な脱アミド化は、グリアジンの解毒を引き起こし、グルタミン残基がCD毒性効果に重要であることを示した。生体内の状況に応じて、小麦グルテンまたはグリアジンをペプシンおよびトリプシンのみで、またはその後パンクレアチンで生体外消化すると、毒性が保持される。このようなCD毒性タンパク質の酵素加水分解物は、無傷のグリアジンおよびグルテンとは対照的に水または塩溶液に可溶であるため、毒性試験の陽性対照として頻繁に使用されてきた。最も引用された例は、いわゆるフレイザーのフラクションIII、小麦グルテンの消化性トリプシン(PT)消化の水溶性部分である¹⁰⁸⁾。グリアジン画分に相当するものとして、ライムギとオオムギのプロラミン画分はCD毒性に関連している。ただし、徹底的なテストを行うことなく、この発見に達した。22人の患者の比較研究は、グリアジン、セカリン、およびホルデインのPT消化物が培養生検に対して同様の毒性効果を誘発することを明らかにした¹⁰⁹⁾。ライ麦と大麦のグルテリン画分は、今日まで調査されていない。オートムギに関する矛盾した結果のため、オートムギプロラミン画分(アベニン)が分離され、*in vivo* チャレンジ、器官培養、およびT細胞テストによりCD毒性について広範囲にテストされた。それぞれCDおよび疱疹状皮膚炎の2人の患者は、5日間毎日2.5gの純粋なアベニンでチャレンジされ、9日後に2.5gでチャレンジされた⁹⁹⁾。腸の生検標本と皮膚の生検サンプルのその後の検査は、アベニ

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

Sample	SI	IFN- γ (pg/ml)
PT-gliadin	7	9
Peptide G9 (α 56–75/E65)	37	180
Peptide G5 (α 56–68/E65)	2	23
Peptide G4 (α 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

^aSI, stimulation index; IFN- γ , interferon- γ ; PT, peptic-tryptic; PTC, peptic-tryptic-chymotryptic.

ンの毒性効果を示さなかった。グリアジンとアベニンの PT 消化物の CD 固有の効果は、CD および非 CD 生検の器官培養試験で比較された。IFN- γ および IL-2 は、免疫原性応答のマーカーとして使用された⁵¹⁾。PT グリアジン ($n=9$) で培養した後、マーカーの大幅な増加が観察された。対照的に、CD 生検 ($n=8$) が PT アベニンとともに培養された場合、反応はなかった。

別の研究では、PT グリアジン、PT セカリン、PT ホルデイン、および PT アベニンは、CD 患者の 5 つの異なる腸 T 細胞株を用いた増殖アッセイを使用して比較テストされた⁵²⁾。結果は、すべての PT 消化物に対するすべての T 細胞株の免疫反応性を示した。ただし、PT アベニンと他の消化物との間には顕著な違いがあった。TG2 で処理すると、グリアジン、セサリン、およびホルデインへの応答が強化された。両方の研究の著者は、T 細胞実験によって示される抗原免疫原性は毒性と同等ではないと結論付けた。これは器官培養試験または *in vivo* チャレンジによって確認する必要がある。最近、3 つのオートムギ栽培品種からのアベニン消化物とグリアジン消化物（陽性対照）およびオリジン消化物（陰性対照）の免疫原性が、10 人の CD 患者から分離された末梢血単核 T 細胞で測定された。T 細胞増殖と IFN- γ 放出の測定により、アベニン消化物に対する異なる品種依存的な反応が高、中程度の免疫原性、

または非免疫原性で示された（表 2.8）⁴⁸⁾。アベニンの免疫原性の程度の違いは、アベニン配列内の異なる免疫原性エピトープの存在に起因している¹⁰³⁾。

3-4. タンパク質タイプの毒性

小麦、ライムギ、および大麦のプロラミンおよびグルテリン画分は、いくつかのタンパク質タイプで構成されている。CD 毒性に関する詳細な研究は不完全で、小麦のグリアジンとグルテニンの種類に限定されている。Hekkens と共同研究者は、CD 患者の小腸への点滴注入とその後の生検によって、明確に定義されたグリアジン画分 A- グリアジンの毒性を最初に示した¹¹⁰⁾。A グリアジンの毒性は、器官培養試験などの *in vitro* 試験で確認された¹¹¹⁾。当時、グリアジン（糖タンパク質）に共有結合する可能性のある炭水化物は、CD 毒性効果（レクチン様反応）に寄与すると疑われていた¹¹²⁾。しかし、A- グリアジンの分析は、共有結合した炭水化物が存在せず、したがって CD の活性化に関与しないことを実証した¹¹³⁾。その後の *in vivo* および *in vitro* の研究により、すべてのグリアジン画分 (α -, β -, γ -, および ω - グリアジンは、電気泳動移動度に関して) CD 毒性作用を誘発した^{114,115)}。この結果は、 α - グリアジンから ω - グリアジンへの毒性の減少という観点に有利だった^{116,117)}。しかし、調査されたサブフラクションはタンパク質タイプに関して必ず

しも純粋ではなく、 ω -フラクションは ω 5-および ω 1,2-タイプに区別されなかった。高度に精製された ω -グリアジン（おそらく ω 5-および ω 1,2-グリアジンの混合物）を使用して、2人のCD患者に直腸導入を試みた¹¹⁸⁾。粘膜CD3+および $\gamma\delta$ +リンパ球による特徴的な反応は、このグリアジンタイプに対する直腸粘膜の特異的な反応を示した。その後、タンパク質の毒性に関する生体内および臓器培養の研究は、合成ペプチドおよびT細胞試験の利用可能性により大幅に減少した。Molbergと同僚は、小麦粉から5つの成分（サブユニット1Ax2, 1Dx5, 1Bx7, 1By9, および1Dy10）で構成されるHMW-GSのサブフラクションを分離し、大腸菌で発現した組換え単一サブユニット1Dx5または1Dy10を使用した¹¹⁹⁾。サブフラクションと単一サブユニットの両方を、HMW-GSに感受性のある一連のT細胞で、ネイティブの形で、またはTG2によって脱アミド化してテストした。結果は、CD患者22人中9人の腸T細胞が脱アミド化されたHMW-GSに応答したが、天然タンパク質には応答しなかった。

生体内チャレンジおよびT細胞試験のために、小麦粉からHMW-GS（1Dx5, 1Bx7, 1By9, 1Dy10）の混合物を分離し、沈殿とHPLCで慎重に精製した¹²⁰⁾。17人のCD患者のうち11人のT細胞株が有意に刺激された。ネイティブおよびTG2脱アミド化サブユニットへの応答の違いは有意ではなかった。3人のCD患者にそれぞれ500mgのサブユニットを投与し、注入を開始してから4時間後に小腸の形態が大きく変化（例えば、絨毛の高さと陰窩の深さの比）した。さらに、小腸におけるIL（Interleukin）-15の発現は、注入の2時間後に増加した。連続して、毒性に関する*in vitro*研究は、それぞれトランスジェニック酵母およびトランスジェニックトウモロコシから精製された単一の組換えHMW-GS1Dx5および1Dy10で実施された¹²¹⁾。CD患者13人中4人のグルテン感受性T細胞がサブユニット1Dx5に反応し、11人中3人がサブユニット1Dy10に反応した。

人の患者の*in vivo*チャレンジによってテストされた両方のサブユニット1Dx5と1Dy10は、陰窩の深さと腸細胞の高さに対する絨毛の高さの比に有意な変化を誘発した。IL-15の染色の増加は、両方のサブユニットでのチャレンジの2時間後に見られた。要約すると、説明した3つの研究は、グリアジン

と同様にHMW-GSがCDを悪化させる可能性があることを明確に示した。その後の研究では、未治療のCD患者がHMW-GS1Dy10に対する抗体レベルを上昇させ、適応免疫応答におけるこのタイプのタンパク質の関与を示していることが実証された¹²²⁾。

グリアジンおよびHMW-GSとは対照的に、LMW-GSおよび単一タンパク質タイプのライムギは、これまでCD毒性についてテストされていない。それらの潜在的な毒性は、対応するペプチドの研究から得られたものである。経口大麦チャレンジによって誘発されたホルデイン感受性T細胞を使用して、CD特異的免疫原性について異なるホルデインタイプをテストした⁷⁴⁾。すべての画分は免疫原性だったが、D-ホルデインおよびC-ホルデインが最も活性が高かった。

3-5. ペプチドの毒性

器官培養試験の導入は、少量を試験できるため、グルテンペプチド毒性に関する研究の新しい分野を開いた。それにもかかわらず、純粋なグルテンペプチドを単離し、特徴づける試みはほとんど行われていない。問題には、グルテンタンパク質画分が多数の成分で構成されており、必要な酵素消化により数百の異なるペプチドが生じるという問題があった。さらに、ペプチドの分取分離の効率は限られており、グルテンタンパク質のアミノ酸配列は1980年代まで知られてなかった。当時、有望な研究は、穀物のタンパク質化学を経験した研究所とCDの研究を行っている病院の協力によってのみ

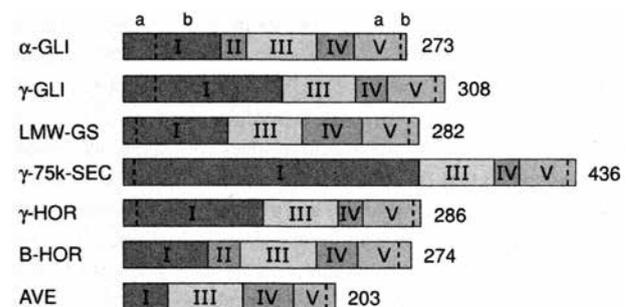


図2.8 小麦、ライムギ、大麦、オートムギのlow-molecular-weight (LMW) グループタンパク質の概略構造 (sections I-II, N 末端ドメイン; sections III-V, C 末端ドメイン; 各タンパク質は表 2.7 に対応; α -GLI, α -gliadin; γ -GLI, γ -gliadin; LMW-GS, wheat low-molecular-weight glutenin subunit; γ -75k-SEC, γ -75k-secalin; γ -HOR, γ -hordein; B-HOR, B-hordein; AVE, avenin).

可能であった。3つのパートナーグループは、総グリアジン¹²³⁻¹²⁵⁾、β-グリアジン¹²⁶⁾、またはα-グリアジン¹²⁷⁾のいずれかの、異なるグリアジン調製物の消化物からペプチドを分離およびテストすることに成功した。一致して、彼らの結果は、セクション I (図 2.8) 内のα-グリアジン (α1-55) のグルタミンおよびプロリンに富む配列が CD の活性化に関与し、他の配列 (α56-68, α247-266) は陰性である (表 2.10)。活性ペプチドに共通のテトラペプチド配列 PSQQ および QQQP は、さらなる調査のための重要な配列であると考えられた。立体配座研究により、β ターンが活性ペプチドの主要な構造的特徴であることが示された¹³²⁾。1991年、α-グリアジンの配列を含む合成ペプチドのパネルが、小腸または腸粘膜の器官培養物への点滴注入によってテストされた。ドデカペプチド α206-217 (PSQQ を含む) は、*in vivo* で毒性効果を示した¹²⁸⁾。α-グリアジンからの3つの合成ペプチドが *in vivo* および *in vitro* でテストされた^{39,45)}。一貫して、ペプチド α31-49 は毒性であることが示されたが、ペプチド α3-21 および α202-220 は毒性ではなかった。後者は、ペプチド α1-30127), α3-24125), および α206-217 と対照的である¹²⁸⁾。さらに、*in vivo* 試験では、合成ペプチド α31-43 および α44-55 が毒性である一方、ペ

プチド α56-68 は不活性であるという証拠が示された¹²⁹⁾。ペプチド α31-55 および α31-43 の器官培養試験では、低濃度での活性が明らかになったが、ペプチド α44-55 は高濃度でのみ活性であることが判明した¹³⁰⁾。単一アミノ酸残基がアラニンで置換されたペプチド α31-49 の変異体は、残基 L31 および P36 が置換された場合、器官培養試験で活性を維持しましたが、残基 P38, P39, および P42 が置換された場合、毒性を失った⁷⁵⁾。寛解期の4人の CD 患者は、ペプチド α56-75 および β-カゼイン由来の陰性対照ペプチド³⁵⁾ による挑戦を受けた。グリアジンペプチドはすべての患者で腸の損傷を引き起こしたが、カゼインペプチドは反応を誘発しなかった。グリアジンペプチド α51-70 の毒性は、器官培養システムを使用して評価された¹³¹⁾。記載されている調査がテストの数、ペプチドの純度、および結果の一致に関して部分的に不十分である場合でも、ほとんどの毒性配列はα-グリアジンのN末端ドメインで発生し、主にグルタミン、プロリン、および疎水性アミノ酸 (ロイシン, フェニルアラニン, チロシン)。γ-およびω-グリアジン, グルテニンサブユニット, セカリン, ホルデイン, およびアベニンの対応する配列は、*in vivo* チャレンジおよび器官培養試験によってまだテストされていない。

表 2.10 注入および器官培養試験により CD 毒性について試験されたペプチドのアミノ酸配列

Sequence	Source	Position	Toxicity ^a	Reference
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	Gliadin	α3-24	+(OC)	[125]
VQQQQFPGQQQPFPPQYPQPQPFPSQQPY	Gliadin	α25-55	+(OC)	[125]
VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQF	A-gliadin	α1-30	+(OC)	[127]
LGQQQFPFPQYPQPQPFPSQQPY	A-gliadin	α31-55	+(OC)	[127]
LQLQPFPPQQLPY	A-gliadin	α56-68	-(OC)	[127]
CNVYIAPYCTIAPFGIFGTN	A-gliadin	α247-266	-(OC)	[127]
LGQGSFRPSQQN	Synthetic	α206-217	+(IN)	[128]
LGQQQFPFPQYPQPQPF	Synthetic	α31-49	+(IN, OC)	[39,45]
QQYPLGQGSFRPSQQNPQA	Synthetic	α202-220	-(IN, OC)	[39,45]
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	Synthetic	α3-21	-(IN, OC)	[39,45]
AGQQQFPFPQYPQPQPF	Synthetic	α31-49, A31	+(OC)	[75]
LGQQQAFPPQYPQPQPF	Synthetic	α31-49, A36	+(OC)	[75]
LGQQQFPAPQYPQPQPF	Synthetic	α31-49, A38	-(OC)	[75]
LGQQQFPAPQYPQPQPF	Synthetic	α31-49, A39	-(OC)	[75]
LGQQQFPFPQAYQPQPF	Synthetic	α31-49, A42	-(OC)	[75]
LGQQQFPFPQPY	Synthetic	α31-43	+(IN)	[129,130]
PQPQPFPSQQPY	Synthetic	α44-55	+(IN)	[129]
LQLQPFPPQQLPY	Synthetic	α56-68	-(IN)	[129]
LQLQPFPPQQLPYQPQLPY	Synthetic	α56-75	+(IN)	[35]
SQQPYLQLQPFPPQQLPYSQ	Synthetic	α51-70	+(OC)	[131]

^aIN, instillation; OC, organ culture.

表 2.11 CD 患者の腸 T 細胞を刺激する選択されたグルテンペプチドのアミノ酸配列

Origin	Sequence ^a	Reference
α 2	LQLQFFPQQLPYQPQLPYQPQ LPYPQPQPF	[136]
α 20	PFRPQQYPQPQPQ	[134]
γ 5	FLQPQQPFQQPQQYPQQPQQPFQ	[138]
γ 5	QFSQPQQQFPQPQ	[136]
LMW 156	QQQQPPFSQQQQSPFSQQQQ	[134]
LMW 17	QQPPFSQQQQQLPQ	[134]
HMW 2	GQQGYPTSPQQS	[133]
HMW 2	QGYPTSPQQSG	[133]
Sec α 2	QFPQPQQFPQSQ	[135]
Sec α 9	PQQFPQPQQFPQ	[135]
Hor α 2	QQFPQPQQFPQQP	[135]
Hor α 9	PQQFPQPQQPFRQ	[135]
Av α 9 ^A	QYQPYPEQQEPFVQ	[135]
Av α 9 ^B	QYQPYPEQQQPFVQ	[135]

^aGlutamine (Q) residues targeted by TG2 are in bold.

CD 活性ペプチドの検索は、腸のグルテン感受性 T 細胞株と CD 患者のクローンを刺激するエピトープにシフトしている。vande Wal¹³³⁾, Vader^{134, 135)}, Arentz-Hansen¹³⁶⁾, および Shanetal^{137, 138)} のグループによって報告された免疫原性ペプチドの第 1 世代 (1999 ~ 2005) の小さな選択を表 2.11 に示した。腸管 T 細胞アッセイにより同定されたより免疫原性の高いペプチドは, Camarca と共同研究者の論文に記載されている¹³⁹⁾。小麦, ライムギ, および大麦のタンパク質の不均一性を考えると, 多数の T 細胞エピトープが存在することは驚くことではない。ペプチドの大部分は HLA-DQ2 に制限されており, グルタミンおよびプロリンが豊富な配列ドメインに由来する。多くの研究は, 患者が異なるエピトープに不均一に反応し, さらに子供と大人の間にも違いのあることを示した¹³⁴⁾。免疫原性グルテンペプチドを検出する別のアプローチは, Tye-Din と共同研究者によって使用された⁵⁰⁾。PBMC (Peripheral blood mononuclear cell = 末梢血単核細胞) は, 3 日間にわたって小麦, ライムギ, または大麦で攻撃された CD 患者から新たに分離された。グリアジン, グルテニン, セカリン, およびホルデイン

に由来する合成ペプチドのライブラリを TG2 で処理し, PBMC とインキュベートし, IFN- γ ELISpot アッセイでスクリーニングした。結果は, 調査したすべてのタイプのグルテンタンパク質からの多数の免疫原性ペプチドを明らかにした。興味深いことに, T 細胞を刺激したペプチドは, 同じ穀物を食べた患者間で同じであった: グリアジンとグルテニンのペプチドは小麦の攻撃後のみ, セカリンのペプチドはライムギの攻撃後のみ, ホルデインのペプチドは大麦の攻撃後のみ刺激性であった。消費された穀物に関係なく, ω - グリアジンと C- ホルデインの 1 つの一般的なペプチド (QFPQPQEPFPW) のみが免疫優性だった。腸の CD4+T 細胞と PBMC の両方を使用した比較研究により, 2 つのアプローチ間の収束を明らかにするいくつかの一般的な免疫原性配列が特定された。米国ネブラスカ大学リンカーン大学食品科学技術部の食物アレルギー研究および資源プログラムは, CD- 活性グルテンペプチドのデータベースを編集した¹⁴⁰⁾。60 以上の出版物に記載されている 1000 を超えるネイティブまたは脱アミド化されたペプチドが含まれている。これらのペプチドは, すべてのタイプの小麦グリアジンとグルテニンに加え

て、ライムギのセサリン、大麦のホルデイン、オートムギのアベニンにも由来している。一部の著者は、CD 活性ペプチドが先天性免疫応答を生成する「毒性」ペプチドと適応免疫応答を生成する「免疫原性」ペプチドに細分した^{31, 141, 142)}。T 細胞検査で同定された免疫原性ペプチドと *in vivo* または臓器培養検査で同定された毒性ペプチドの数の違いは異常である :1014 ペプチドは免疫原性, 9 ペプチドは毒性, 5 ペプチドは毒性および免疫原性として分類されている。いずれにせよ, 免疫原性が毒性に対応するかどうかの問題は回答されていない¹⁴³⁾。要約すると, 毒性 / 免疫原性ペプチドに共通する特徴は, 複数のプロリンおよびグルタミン残基の存在である。これにより, 4 つのユニークな構造的および機能的特性が生じる^{138, 144)} : 1. これらのペプチドは, プロ

リン含有量が高いため, 胃, 膵臓, および腸の消化プロテアーゼによるタンパク質分解に対して非常に耐性がある。結果として, 潜在的に免疫原性のペプチドの高い腸内濃度は, グルテンを含む食事の後に維持される。2. これらのグルテンペプチドの選択されたグルタミン残基は, 生理学的条件下で TG2 によって脱アミド化またはトランスアミド化され, 免疫原性の強化につながる。3. プロリンが豊富なグルテンペプチドは, 自然に左結合ポリプロリン II ラセン構造を採用する。これは, 結合したすべての主要組織適合性複合体クラス II リガンドの好ましい構造である。4. 複数の HLA-DQ 結合エピートープを含む大きなペプチドは, 1 つのエピートープのみを含む小さなペプチドよりも大きな T 細胞刺激活性を示す。

References 3

77. Ciacci C., Maiuri L., Caporaso N., Bucci C., delGiudice L., Rita-Massard o D. *et al.*: Celiac disease: *in vitro* and *in vivo* safety and palatability of wheat-free sorghum food products. *Clin Nutr.* 2007; **26**: 799–805.
78. Pontieri P., Mamone G., de Caro S., Tuinstra M.R., Roemer E., Okot J. *et al.*: Sorghum, a healthy and gluten-free food for celiac patients as demonstrated by genome, biochemical, and immunochemical analyses. *J Agric Food Chem.* 2013; **61**: 2565–2571.
79. Kasarda D.D. Toxic cereals in coeliac disease. In: Feighery C., O'Farrelly C., eds. *Gastrointestinal immunology and gluten-sensitive disease*. Dublin (Ireland): Oak Tree Press; 1994: 203–220.
80. Kasarda D.D. Grains in relation to celiac *Cereal Foods World.* 2001; **46**: 209–210.
81. Forssell F., Wieser H. Dinkel und Zöliakie. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1995; **201**: 35–39.
82. Wieser H. Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *Eur Food Res Technol.* 2000; **211**: 262–268.
83. vandenBroeck H.C., Smulders M.J.M., Hamer R.J., Gilissen L.J.W.J., v an der Meer I. Coeliac-safe wheat. A novel wheat to decrease the prevalence and symptoms of coeliac disease. *Agro Food Ind Hi-Tech.* 2011; **22**: 18–21.
84. Wieser H. Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. III. N-terminal amino acid sequences of α -gliadins potentially toxic for coeliac patients. *Eur Food Res Technol.* 2001; **213**: 183–186.
85. Molberg O., Uhlen A.K., Jensen T., Solheim-Flaete N., Fleckenstein B., Arentz-Hansen H. *et al.*: Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: implications for celiac disease. *Gastroenterology.* 2005; **128**: 393–401.
86. Pizzuti D., Buda A., D'Odorico A., D'Inca R., Chiarelli S., Curioni A. *et al.*: Lack of intestinal mucosal toxicity of Triticum monococcum in celiac disease patients. *Scand J Gastroenterol.* 2006; **41**: 1305–1311.
87. Gianfrani C., Maglio M., Rotondi-Aufiero V., Camarca A., Vocca I., Iaqui into G. *et al.*: Immunogenicity of monococcum wheat in celiac patients. *Am J Clin Nutr.* 2012; **96**: 1339–1345.
88. Pulido O.M., Gillespie Z., Zarkadas M., Dubois S., Vavasour E., Rashid M. *et al.*: Introduction of oats in the diet of individuals with celiac disease: a systematic review. *Adv Food Nutr Res.* 2009; **57**: 235–285.
89. Sontag-Strohm T., Lehtinen P., Kaukoviirta-Norja A. Oat products and Z Lebensm their current status in the celiac diet. In: Arendt E.K., dal Bello F., eds. *Gluten-free cereal products and beverages*. New York (USA): Academic Press; 2008:191–202.
90. Pawlowska P., Diowksz A., Kordialik-Bogacka E. State-of-the-art incorporation of oats into a gluten-free diet. *Food Rev Int.* 2012; **28**: 330–342.
91. Cooper S.E.J., Kennedy N.P., Mohamed B.M., Abuzakouk M., Dunne J., Byrne G. *et al.*: Immunological indicators of coeliac disease activity are not altered by long-term oats challenge. *Clin Exp Immunol.* 2013; **171**: 313–318.
92. Janatuinen E.K., Kemppainen T.A., Julkunen R.J.K., Kosma V.M., Mae ki M., Heikkinen M. *et al.*: No harm from five years ingestion of oats in coeliac disease. *Gut.* 2002; **50**: 332–335.
93. Koskinen O., Villanen M., Korponay-Szabo I., Lindfors K., Maeki M., K aukinen K. Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; **48**: 559–565.
94. Hardman C.M., Garioch J.J., Leonard J.N., Thomas H.J., Walker M.M., Lortan J.E. *et al.*: Absence of toxicity of oats in patients with

- dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med.* 1997; **337**: 1884–1887.
95. Reunala T., Collin P., Holm K., Pikkarainen P., Miettinen A., Vuolteenaho N. *et al.*: Tolerance to oats in dermatitis herpetiformis. *Gut.* 1998; **43**: 490–493.
 96. Lundin K.E.A., Nilsen E.M., Scott H.G., Loberg E.M., Gjoen A., Bratlie J. *et al.*: Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut.* 2003; **52**: 1649–1652.
 97. Arentz-Hansen H., Fleckenstein B., Molberg O., Scott H., Koning F., Ju ng G. *et al.*: The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med.* 2004; **1**: 84–92.
 98. Salovaara H., Kanerva P., Kaukinen K., Sontag-Strohm T. Oats – an overview from celiac disease point of view. In: Arendt E.K., Dal Bello F., eds. *The science of gluten-free foods and beverages*. St. Paul (USA): AACC International; 2009: 69–82.
 99. Hardman C., Fry L., Tatham A., Thomas H.J. Absence of toxicity of avenin in patients with dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med.* 1999; **340**: 321.
 100. Zimmer K.P. Nutrition and celiac disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011; **41**: 244–247.
 101. Koerner T.B., Cleroux C., Poirier C., Cantin I., Alimkulov A., Elampar o H. Gluten contamination in the Canadian commercial oat supply. *Food Addit Contam.* 2011; **28**: 705–710.
 102. Mujico J.R., Mitea C., Gilissen L.J.W.J., deRu A., vanVeelen P., Smulders M.J.M. *et al.*: Natural variation in avenin epitopes among oat varieties: implications for celiac disease. *J Cereal Sci.* 2011; **54**: 8–12.
 103. Real A., Comino I., deLorenzo F., Merchan F., Gil-Humanes J., Gimenez M.J. *et al.*: Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One.* 2012; **7**: e48365.
 104. Londono D.M., van 'tWestende W.P.C., Goryunova S., Salentijn E.M.J., van den Broeck H.C., van der Meer I.M. *et al.*: Avenin diversity analysis of the genus *Avena* (oat). Relevance for people with celiac disease. *J Cereal Sci.* 2013; **58**: 170–177.
 105. van de Kamer J.H., Weijers H.A., Dicke W.K. Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953; **42**: 223–231.
 106. Lew E.J.L., Kuzmicky D.D., Kasarda D.D. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem.* 1992; **69**: 508–515.
 107. Wieser H., Seilmeier W., Belitz H.D. Characterization of ethanol-extractable reduced subunits of glutenin separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Cereal Sci.* 1990; **12**: 63–71.
 108. Frazer A.C., Fletcher R.F., Ross C.A., Shaw B., Sammons H.G., Schneider R. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. *Lancet.* 1959; **2**: 252–255.
 109. Bracken S.C., Kilmartin C., Wieser H., Jackson J., Feighery C. Barley and rye prolamins induce an mRNA interferon- γ response in coeliac mucosa. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; **23**: 1307–1314.
 110. Hekkens W.T.J.M. The toxicity of gliadin, a review. In: McNicholl B., McCarthy C.F., Fottrell P.F., eds. *Perspectives in coeliac disease*. Lancaster (UK): MTP Press; 1978: 3–15.
 111. Falchuk Z.M., Nelson D.L., Katz A.J., Bernardin J.E., Kasarda D.D., Hague N.E. *et al.*: Gluten-sensitive enteropathy: influence of histocompatibility type on gluten sensitivity *in vitro*. *J Clin Invest.* 1980; **66**: 227–233.
 112. Koettgen E., Volk B., Mueller M., Gerok W. Studies on the lectin properties of gluten and on the pathomechanism of celiac disease. *Fresenius Z Anal Chem.* 1984; **317**: 702–703.
 113. Bernardin J.E., Saunders R.M., Kasarda D.D. Absence of carbohydrate in celiac-toxic A-gliadin. *Cereal Chem.* 1976; **53**: 612–614.
 114. Ciclitira P.J., Evans D.J., Fagg N.L., Lennox E.S., Dowling R.H. Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. *Clin Sci.* 1984; **66**: 357–364.
 115. Howdle P.D., Ciclitira P.J., Simpson F.G., Losowsky M.S. Are all gliadins toxic in coeliac disease? an *in vitro* study of alpha, beta, gamma and omega gliadins. *Scand J Gastroenterol.* 1984; **19**: 41–47.
 116. Jos J., Charbonnier L., Mougnot J.F., Mosse J., Rey J. Isolation and characterization of the toxic fraction of wheat gliadin in celiac disease. In: McNicholl B., McCarthy C.F., Fottrell P.E., eds. *Perspectives in coeliac disease*. Lancaster (UK): MTP Press; 1978: 75–90.
 117. Sinclair T.S., Ohannesian A.D., Jones D. Which gliadin fraction is toxic? *Gut.* 1983; **24**: A492.
 118. Ensari A., Marsh M.N., Moriarty K.J., Moore C.M., Fido R.J., Tatham A.S. Studies *in vivo* of ω -gliadins in gluten sensitivity (coeliac sprue disease). *Clin Sci.* 1998; **95**: 419–424.
 119. Molberg O., Solheim-Flaete N., Jensen T., Lundin K.E.A., Arentz-Hansen H., Anderson O.D. *et al.*: Intestinal T-cell high-molecular-weight glutenins disease. *Gastroenterology.* 2003; **125**: 337–344.
 120. Dewar D.H., Amato M., Ellis H.J., Pollock E.L., Gonzalez-Cinca N., Wieser H. *et al.*: The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006; **18**: 483–491.
 121. Ellis H.J., Dewar D.H., Gonzales-Cinca N., Pollock E.L., Wieser H., Ciclitira P.J. The toxicity of recombinant high-molecular-weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. In: Stern M., ed. *Proceedings of the 20th meeting of the working group on prolamins analysis and toxicity*. Zwickau (Germany): Verlag Wissenschaftliche Scripten; 2006: 83–85.
 122. Ellis H.J., Lozano-Sanchez P., Bermudo-Redondo C., Suligoi T., Biagi F., Bianchi P.I. *et al.*: Antibodies to wheat high-molecular-weight glutenin subunits in patients with celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; **159**: 428–434.

123. Wieser H., Belitz H.D., Ashkenazi A., Idar D. Isolation of coeliac active peptide fractions from gliadin. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1983; **176**: 85–94.
124. Wieser H., Belitz H.D., Ashkenazi A. Amino acid sequence of the coeliac active peptide B3142. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1984; **179**: 371–376.
125. Wieser H., Belitz H.D., Idar D., Ashkenazi A. Coeliac activity of the gliadin peptides CT-1 and CT-2. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1986; **182**: 115–117.
126. Jos J., deTand M.F., Arnaud-Battandier F., Boissel J.P., Popineau Y., Wajcman H. Separation of pure toxic peptides from a β -gliadin subfraction using high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta.* 1983; **134**: 189–198.
127. deRitis G., Auricchio S., Jones H.W., Lew E.J.L., Bernardin J.E., Kasa rda D.D. *in vitro* (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology.* 1988; **94**: 41–49.
128. Mantzaris G., Jewell D.P. toxicity of a synthetic dodecapeptide from A gliadin in patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 1991; **26**: 392–398.
129. Marsh M.N., Morgan S., Ensari A., Wardle T., Lobley R., Mills C. *et al.*: *In vivo* activity of peptides 31–43, 44–55, 56–68 of α -gliadin in gluten sensitive enteropathy (GSE). *Gastroenterology.* 1995; **108**: A871.
130. Maiuri L., Troncone R., Mayer M., Coletta S., Picarelli A., de Vincenzi M. *et al.*: *in vitro* activities of A-gliadin related synthetic peptides. Damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 1996; **31**: 247–253.
131. Martucci S., Fraser J.S., Biagi F., Corazza G.R., Ciclitira P.J., Ellis H. J. Characterizing one of the DQ2 candidate epitopes in coeliac disease: A-gliadin 51–70 toxicity assessed using an organ culture system. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003; **15**: 1293–1298.
132. Tatham A.S., Marsh M.N., Wieser H., Shewry P.R. Conformational studies of peptides corresponding to the coeliac-activating regions of wheat α -gliadins. *Biochem J.* 1990; **270**: 313–318.
133. van de Wal Y., Kooy Y.M.C., van Veelen P., Vader W., August S.A., Drijfhout J.W. *et al.*: Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Immunol.* 1999; **29**: 3133–3139.
134. Vader W., Kooy Y., vanRu A., Harris D., Benckhuijsen W. *et al.*: The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology.* 2002; **122**: 1729–1737.
135. Vader L.W., Stepniak D.T., Bunnick E.M., Kooy Y.M.C., de Haan W., Drijfhout J.W. *et al.*: Characterization of cereal toxicity for celiac patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology.* 2003; **125**: 1105–1113.
136. Arentz-Hansen H., McAdam S.N., Molberg O., Fleckenstein B., Lundin K.E.A., Joergensen T.J.D. *et al.*: Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology.* 2002; **123**: 803–809.
137. Shan L., Molberg O., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M. *et al.*: Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 2002; **297**: 2275–2279.
138. Shan L., Qiao S.W., Arentz-Hansen H., Molberg O., Gray G.M., Sollid L.M. *et al.*: Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res.* 2005; **4**: 1732–1741.
139. Camarca A., del Mastro A., Gianfrani C. Repertoire of gluten peptides active in celiac disease patients: perspectives for translational therapeutic applications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012; **12**: 207–219.
140. <http://www.allergenonline.org>.
141. Ciccocioppo R., di Sabatino A., Corazza G.R. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 2005; **140**: 408–416.
142. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011; **91**: 151–176.
143. Stern M., Ciclitira P.J., van Eckert R., Feighery C., Janssen F.W., Mendez E. *et al.*: Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001; **13**: 741–747.
144. Kim C.Y., Quarsten H., Bergseng E., Khosla C., Sollid L.M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; **101**: 4175–4179.



「希太郎ブレンド」が苦くないわけ

東京薬科大学名誉教授 岡 希太郎

Key Words: 浅煎りコーヒー, 深煎りコーヒー, ブレンドコーヒー, クロロゲン酸, ニコチン酸

希太郎ブレンドとは、ライトまたはそれより浅く煎った豆と、フレンチまたはイタリアンの黒光りするほど深く煎った豆を、味と健康志向の好みに応じて混ぜ合わせるブレンドコーヒーのことで、本来なら苦味の強いコーヒーが、想像を超えるほどに苦味が消える特性を示します。

コーヒー豆は煎れば煎るほど苦くなります。苦味成分が出来てくるからです。化学構造式が明らかな苦味成分は図1のようなもので、ドリップ式で淹れれば、カフェインの他に、焙煎中にクロロゲン酸から出来る苦味成分が抽出されます。コーヒー最強の苦味はジテルペン誘導体のモザンビオシドで、ロブスタ豆よりア

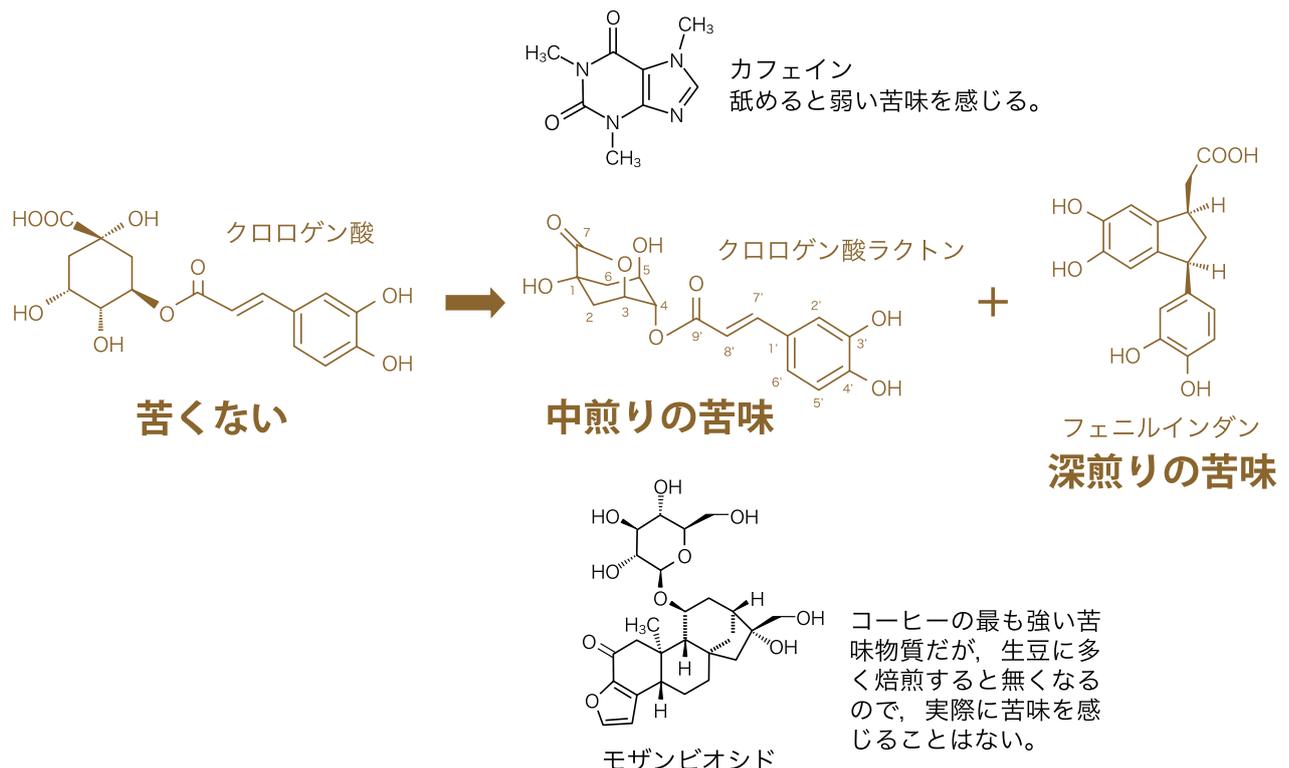


図1 コーヒーの苦味成分

ラビカ豆に多く含まれているそうですが、焙煎中に分解して減ってしまうので、実際に苦味を感じることはありません¹⁾。

図1の苦味成分について説明します。まずカフェインは、その結晶を舐めると苦味を感じます。しかし、コーヒー1杯(豆10gを100mLの湯で抽出)に100mgが溶けていても、1000倍希釈に相当するため、ヒトの舌が苦味を感じるギリギリの濃度です。ですから実際に苦味を感じる苦味物質は、カフェインではなく、クロロゲン酸由来のクロロゲン酸ラクトンとフェニルインダンということになります。

クロロゲン酸ラクトンとフェニルインダンを比べると、フェニルインダンの苦味の方が強いのですが、飲めないほどではないようです。ところが、深く煎ったコーヒー豆には、他にも苦味物質が入っています。主なものはコーヒー色の成分で、メラノイジンと総称される混合物です。その中に苦い、渋い、辛い、不味い……といったような複雑な味を感じる化合物があるのですが、化学構造との対応は不明です。

このように、まだよく解らない成分もありますが、ごく普通のドリップコーヒーに入っているクロロゲン酸由来の苦味成分そのものは、筆者にとって「飲みたくないほど苦い」ものではありません。皆さんも、もし興味があるなら、簡単な実験で確かめることができます(図2)。

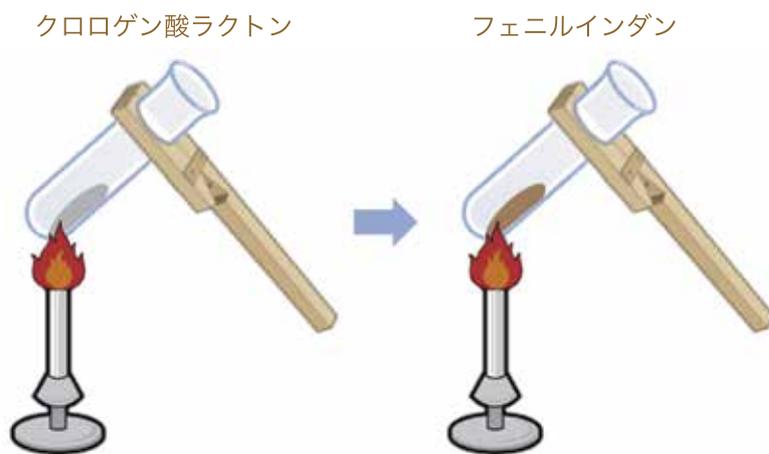


図2 クロロゲン酸結晶の加熱分解

●クロロゲン酸の結晶を試験管に入れてガスバーナーで加熱する。

【実験】試薬として購入したクロロゲン酸の結晶100mgを試験管に入れて、その試験管をガスバーナーの火で加熱する。結晶が融けたら火を消して、内容物を少しだけスパテル(金属製の耳かき)に取り、冷めたら舐めてみる。再度加熱して、味見を繰り返す。次第に苦味が増すが、吐き出したくなるような嫌な苦味ではない。内容物が黒くなったら終了です。

この実験で、まず結晶が融け始めると苦味が出始めます。その苦味はクロロゲン酸ラクトンの苦味です。更に熱をかけると茶色を帯びて、フェニルインダンの苦味に変わってきます。実験に成功するコツは、色の変化が解るようにゆっくり加熱することです。

さて苦味成分は、深煎りコーヒーの味の決め手と考えられてきましたが、今年になってUCC上島珈琲研究所から、驚くべき論文が出てきました。

●弱い苦味のコーヒー抽出液にニコチン酸(またはニコチン酸アミド)を加えると、強い苦味になる²⁾。

ニコチン酸自身は苦くないのですが、苦い味の水溶液にニコチン酸を加えると、苦味が強まるというのです。論文は英文で、実験データを正確に説明していますが、一般の人にも理解できる日本語の解説が、同社ホームページに載っています³⁾。UCCの論文を読んで、コーヒーの苦味に対する筆者の考えは次のように変わりました。

●コーヒーを深く煎っていると、急に苦味が強くなるのは、苦味成分が増えることに加えて、ニコチン酸が増えることが関与している(図3右側のニコチン酸のカーブを参照)。

昔から、深煎りコーヒーにミルクや砂糖を入れて飲む習慣がありました。主に苦味を減らすためでした。し

かし今では生活習慣病を予防するため「砂糖やミルクの使用を控えるべき」という意見が主流です。苦味が苦手な人は、ちょっと苦いコーヒーを飲んだだけで気分が悪くなるので、専門家が「コーヒーは健康に良い」といくら言っても、気分良く飲むことは出来ません。

ニコチン酸（ナイアシンともいう）は焙煎したコーヒー豆に入っている唯一のビタミンで、しかもその量は他の食品では真似できない多さです。ですから深煎りコーヒーを飲むことは、ニコチン酸補給にとって、掛け替えのない生活習慣と言えるのです。ニコチン酸が、特に高齢者にとっては、非常に大切な栄養素であることは、確立された科学になっています⁴⁾。

筆者はそういうニコチン酸を含む苦いコーヒーを、飲みやすいコーヒーにするために、超浅煎り豆（図3の左側）とブレンドして「希太郎ブレンド」を作りました。クロロゲン酸は、ポリフェノールとして体内で抗酸化作用を發揮しますが、筆者は更に「クロロゲン酸が苦味を消す」ことに注目したのです。

●目薬の研究で、クロロゲン酸が苦味を消すことが解っていた⁵⁾。

ドライアイに効くという目薬をさすと、食べ物が苦くなるという副作用があります。これを解消するために、コーヒーを飲むとよいという論文があります。コーヒーの苦味を消す成分はクロロゲン酸であると推測されていました。クロロゲン酸を最も多く含んでいるのは生豆です。しかし、生豆をそのまま飲んでも美味しくありません。そこでクロロゲン酸が分解し始める直前まで焙煎すれば、それがクロロゲン酸を最も多く含む焙煎豆ということになります。図3で言えば、第1ハゼ音が聞こえたら焙煎を止めればよいのです。筆者はこれを超浅煎り豆と呼んでいます。そして、この超浅煎り豆に含まれている生豆とほぼ等しい大量のクロロゲン酸が、深煎り豆とブレンドしたときに、飲みにくい苦味を消してくれるということです。

●ニコチン酸が強める苦味をクロロゲン酸が消してくれる⁶⁾。

この論文は、希太郎ブレンドが「ニコチン酸を多く含んでいても苦くない」という現象に、科学的根拠を

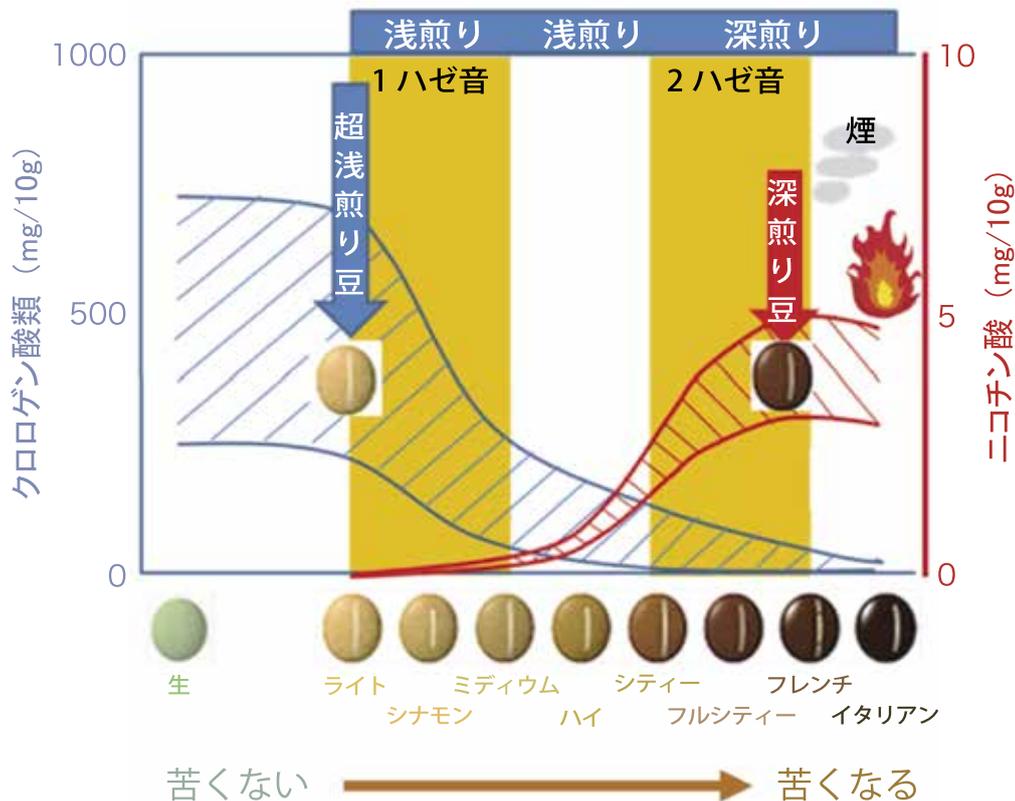


図3 希太郎ブレンドの焙煎度と苦味の関係

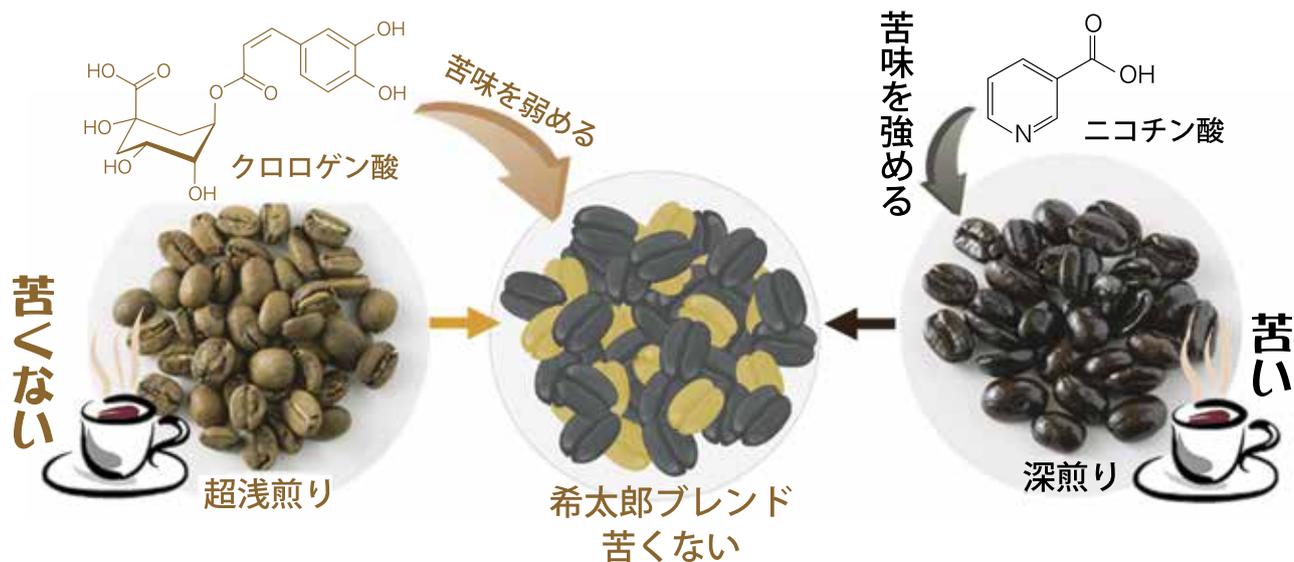


図4 希太郎ブレンドが苦くない分子メカニズム

与えてくれました。いわば希太郎ブレンドが苦なくなる分子メカニズムということです。この関係を図4に描いてみました。

●以上をまとめると、希太郎ブレンドの焙煎度と苦味の関係は以下1～3の通りです。

1. 深煎豆はニコチン酸を多く含み、苦味成分の苦味を強めて非常に苦い(図4の右)。
2. 超浅煎豆は生豆と同程度の大量のクロロゲン酸を含んでいて苦くない(図4の左)。
3. 超浅煎豆のクロロゲン酸モル濃度は、深煎豆のニコチン酸モル濃度の10倍を超えるので、ブレンド比1:1であれば苦味はほぼ完全に消えてしまう。

そこで「希太郎ブレンド」に香味の多様性を期待して、「6:4」とか「4:6」を作ってみました。勿論、1:9も9:1も、人それぞれの好みに応じて自由に調整することは簡単です。朝と夕に飲むコーヒーを、日中の活動性と夜間の睡眠といった生活のリズムを維持するように改善する工夫も考えられるでしょう。希太郎ブレンドの飲み方には、飲む人の嗜好が反映されると言えるのです。

参考文献

1. Lang R, Klade S, Beusch A, *et al.*: Mozambioside is an arabica-specific bitter-tasting furokaurane glucoside in coffee beans. *J Agric Food Chem.* **63**: 10492-9, 2015.
2. Fujimoto H, Narita Y, Iwai K, *et al.*: Bitterness compounds in coffee brew measured by analytical instruments and taste sensing system. *Food Chem.* **342**: 128228, 2021.
3. UCC : <https://www.ucc.co.jp/company/research/taste/bittertaste.html>
4. McReynolds MR, Chellappa K, Baur JA.: Age-related NAD⁺ decline. *Exp Gerontol.* **134**: 110888, 2020.
5. Shiraishi S, Haraguchi T, Nakamura S, *et al.*: Suppression in bitterness intensity of bitter basic drug by chlorogenic acid. *Chem Pharm Bull.* **65**: 151-6, 2017.
6. Gao C, Tello E, Peterson DG.: Identification of coffee compounds that suppress bitterness of brew. *Food Chem.* **350**: 129225, 2021.

希太郎ブレンド[®]

Kitaroblend — 美と若さ —

コーヒーは「百薬の王」

希太郎ブレンド[®]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B₃「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[®]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



城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

アサガオ *Ipomoea nil* (L.) Roth (= *Pharbitis nil* (L.) Choisy) (ヒルガオ科 Convolvulaceae)

連絡先：城西大学薬学部
shiratak@josai.ac.jp

真夏，暑い太陽の照り付ける日の朝，もうアサガオが咲いています。アサガオは，ヒマラヤから中国にかけての地域，または熱帯アジア原産とされてきましたが，近年，熱帯アメリカを原産地とする説が出されています。つる性の一年生草本で茎には逆毛があり，左巻き（つるの巻き方は上から見るか，下から見るかで逆になります。ここでは上から見て左巻き）で他の物に巻き付き，長さ2m以上に達します。葉は互生し葉柄は長く葉身は広三尖形で細毛があり，夏，花柄を腋出し先端に1～3個の大型の円錐形の花を朝早く開きます。花は，がく5，花弁5(1)，雄しべ5，雌しべ1からなり，5枚の花弁は融合して漏斗状になっています。花の色は，紅，青，白など変化に富み，しぼりもあって園芸用に多くの品種があり，それぞれの花弁の中央



写真1 アサガオ (花1)



写真2 アサガオ (花2)



写真3 アサガオ (花3)



写真4 アサガオ (花4)



写真5 アサガオ (双葉)

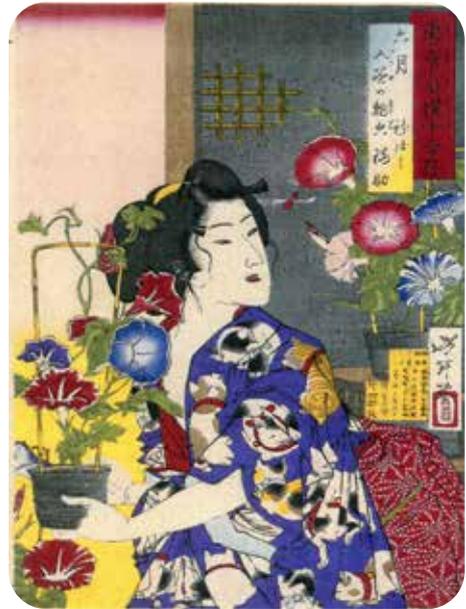


写真6 浮世絵 (明治時代初期の入谷朝顔市)



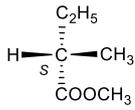
写真7 ノアサガオ (花)

には放射状の中肋^{ちゅうろく} (アサガオでは特に「曜^{よう}」という) が走り、子房は3室、各子房室には2つの胚珠があります。日本で最も発達した園芸植物の一つで、アサガオは中国語で「牽牛」、日本では「舜」の漢字もあてられています。日本へは、奈良時代末期に遣唐使が種子を薬用 (下劑) に持ち帰ったとされ平安時代には薬用植物として扱われました。アサガオの名は、朝早く花が咲き、午前中にしぼむことに由来します。なお、万葉集などで「朝顔」とよばれている

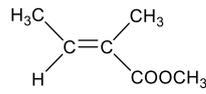
ものは、本種ではなく、キキョウまたはムクゲをさしているものと思われます。

秋、果実が黄変し始める頃、地上部を刈り取り、日干し後、打ち砕いて採取した成熟種子は、ケンゴシ (牽牛子 *Pharbitidis Semen*) といい、粉末を緩下薬 (一日量 0.2 ~ 0.3 g) 峻下薬 (一日量 0.5 ~ 1.5 g) として、主に家庭薬原料に用いられます。漢方では、浮腫や腹水、喘息、痰飲、食滞、便秘などに瀉下薬、利尿薬として、茵陳散や牽牛散などに配剤されます。成分としては、*n*-butanol 抽出物の ether 不溶性画分を加水分解したもののメチル化体から 2-methylbutyric acid methyl ester, tiglic acid methyl ester, nilic acid methyl ester, dihydroxytetradecanoic acid methyl ester, dihydroxyhexadecanoic acid methyl ester など、また、これらの酸を構成成分とする樹脂配糖体の pharbitic acid B, C, D^{1,2,3)}, pharesinoside A⁴⁾, サポニンの pharbitoside A, B⁵⁾ などが報告されています。なお、牽牛子の名は、農民が牛をひいて本生薬 (ケンゴシ) のお礼参り行ったことによるそうです。

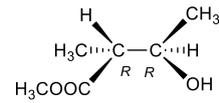
アサガオの品種改良の歴史としては、江戸時代、文化・文政期 (1804 年 ~ 1830 年) と嘉永・安政期 (1848 年 ~ 1860 年) に2度のブームがあり、品種改良が大きく進みました。ブームの発端は、文化3年 (1806 年) の江戸の大火で下谷に広大な空き地ができ、そこに下谷・御徒町村付近の植木職人がいろいろな珍しいアサガオを咲かせ、その後、趣味としてだけでなく、下級武士の御徒^{おたく}が内職のひとつとして組屋敷の庭を利用してアサガオを栽培するようになったことによります。また、熊本藩では武士たちによる園芸が盛んでアサガオもキク、シャクヤク、ツバキなどと共に愛好され、盛んに育種されて「肥後アサガオ」とよばれる系統が生まれ、大輪アサガオの祖先の一つとなりました。アサガオの花の色は、原種は薄い青色ですが、品種改良によって白、紅色、ピンク、紫、濃紺、浅黄色等の品種が生まれました。しかし、今日でも「黄色のアサガオ」



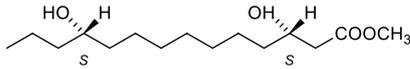
2-methylbutyric acid
methyl ester



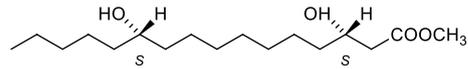
tiglic acid
methyl ester



nilic acid
methyl ester



dihydroxytetradecanoic acid
methyl ester



dihydroxyhexadecanoic acid
methyl ester

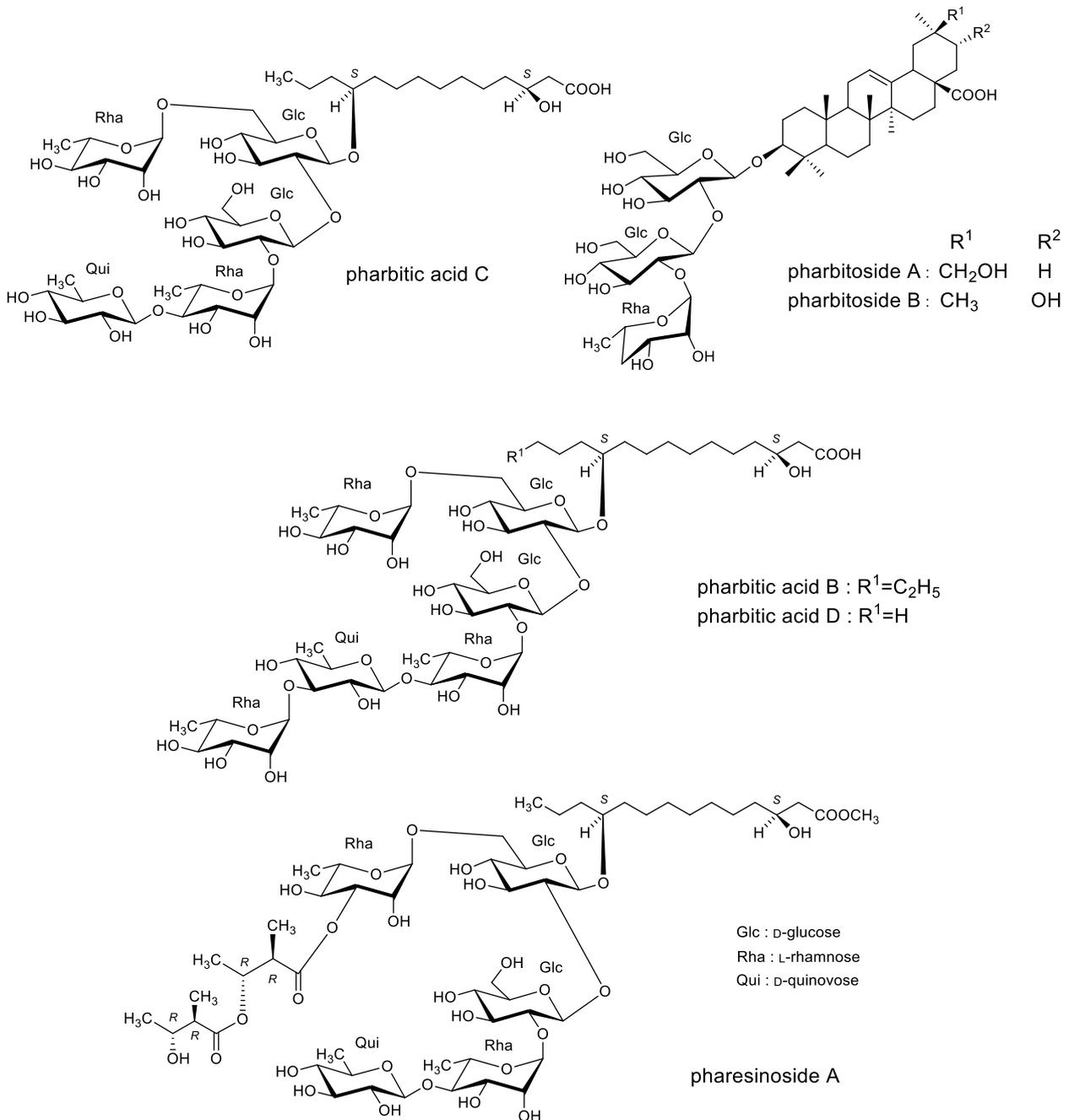


図1 成分の構造式



写真8 チョウセンアサガオ (花, 八重咲き)



写真9 ケチョウセンアサガオ (花)



写真10 キダチチョウセンアサガオ (花)



写真11 生薬 ケンゴシ (牽牛子)

と「黒色のアサガオ」は「幻のアサガオ」とよばれています。また、米田芳秋（静岡大学名誉教授）によって開発された「^{ようじろ}曜白アサガオ」は、熱帯アメリカ原産のマルバアサガオとアフリカ系のアサガオを交配させ、さらに日本の伝統品種との掛け合わせによって品種改良を重ねた花卉の曜の部分の部分が白くなった系統です。江戸時代、アサガオの花は七夕の頃に咲くことや花の咲いたアサガオは「彦星」と「織姫星」が年に一度会えることにちなんで縁起物とされ、アサガオの鉢植えが牛の引く荷車に積まれて売り歩かれるようになり、愛好家たちによって品種改良が進み、庶民は植木市や朝顔売りからアサガオを購入しました。このような御家人や下級武士によるアサガオの栽培、販売が発展して明治時代初期から入谷朝顔市が始まり、通常、七夕を挟む7月6～8日に催されます。

ノアサガオ *Ipomoea indica* は、沖縄原産の野生種で関東以南では越冬して成長し古い茎はやや木質化します。草勢は強く垣根や家の壁面などをカーテン状に覆い尽くすほどです。葉もアサガオより大きく掌大のハート形で、花の色は時刻と気温によって変わり、早朝は青く昼は紫になります。ノアサガオの園芸品種が「琉球アサガオ」「オーシャンブルー」「宿根アサガオ」などとよばれているものです。なお、アサガオの名のつく植物にはヤエチョウセンアサガオ *Datura fastuosa*、ケチョウセンアサガオ *D. innoxia*、キダチチョウセンアサガオ（エンジェルストラランペット） *Brugmansia versicolor* などがありますが、これらはナス科 *Solanaceae* に属する有毒植物です。決して口に入れないでください。主な中毒症状は、嘔吐、下痢、血便、瞳孔散大、めまい、幻覚、異常興奮などで、最悪の場合には死に至ります。

参考文献

1. Hikaru Okabe, *et. al.*: Studies on Resin Glycosides II. Unhomogeneity of “Pharbitic Acid” and Isolation and Partial Structures of Pharbitic Acids C and D, the Major Constituents of “Pharbitic Acid”, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**: 2394-2403, 1971.
2. Masateru Ono, *et. al.*: Resin Glycosides VII. Reinvestigation of the Component Organic and Glycosidic Acids of Pharbitin, the Crude Ether-Insoluble Resin Glycoside (“Convolvulin”) of Pharbitidis Semen (Seeds of *Pharbitis nil*), *Chem. Pharm. Bull.*, **38**: 1892-1897, 1990.
3. Masateru Ono, *et. al.*: Acylated Glycosides of Hydroxy Fatty Acid Methyl Esters Generated from the Crude Resin Glycoside (Pharbitin) of Seeds of *Pharbitis nil* by Treatment with Indium(III) Chloride in Methanol, *J. Nat. Prod.*, **73**: 1846-1852, 2010.
4. Li-Juan Bai, *et. al.*: Pharesinosides A-G, acylated glycosidic acid methyl esters derivatized by NH₂ silica gel on-column catalyzation from the crude resin glycosides of Pharbitis Semen, *Tetrahedron*, **73**: 2863-2871, 2017.
5. Da Young Jung, *et. al.*: Triterpenoid Saponins from the Seeds of *Pharbitis nil*, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**: 203-206, 2008.

より良い特許明細書を求めて（パート 2）

宮部 正明 (MIYABE Masaaki)

Key Words: 特許, 特許明細書, 文章表現, 国際公開公報

はじめに

特許は特許明細書の作成に始まって、特許明細書の解釈に終わると言われています。それ故に、特許明細書の記載は重要であり、特許明細書は文章として記載されるため文章表現の巧拙が問題となります。より良い特許明細書を求めて、文章表現の素養を磨くヒントを小林秀雄の作品から提案したいと思います。

1. より良い特許明細書を求めて

筆者は本誌の、「より良い特許明細書を求めて¹⁾」において、“特許請求の範囲の意味、特許明細書の全体構造の理解、特許発明の本質を求めて、具体例としての国際公開公報”を提案しました。

そして、特許請求の範囲を書くことの難しさについては、<中山の次の様な文章からも理解できる。「特許発明は、具体的な物として存在するのではなく、明細書に文章として記載されている。しかしながら、文章によってその技術的範囲を完全に表現することは不可能であり、それゆえ文章の解釈を通じて技術的範囲を決定しなければならないという宿命を負っている」>と記述しました。

そこで本稿では、文章表現の素養を磨くために小林秀雄の作品を読むことを薦めたいと思います。

小林秀雄は批評家で、1902年東京で生まれ、1983年に80歳で世を去りました。その80年の生涯において、「ドフトエフスキーの生活」「モーツァルト」「ゴッホの手紙」「近代絵画」「本居宣長」などの著書を執筆し、日本における近代批評の創始者、確立者として大きな足跡を残した人物です。

筆者は本誌の、いい文章の特許明細書を求めて²⁾の中で、<しかしながら、いい文章の特許明細書を書くことは難しい。いい文章とは何か、その解は難しいし、永遠の課題のように思われる。いい文章の要素として、その構成単位である“言葉”と、言葉の組み合わせである“表現”が重要と考える。司馬遼太郎は言葉について、“珠玉の言葉を4万語の中から探す”といい、小林秀雄は表現することについて、“表現するとは、己を押し潰して中身を出す事だ、己の脳漿を搾る事だ”と述べている。小林秀雄を読んでいて、・文章を書くことの喜び、・絵や音楽といった芸術に触れることの喜び、・文学を鑑賞することの喜び、・議論することの喜び、・深く考えることの喜び、・批評の精神を教えてくれる。何故か判らないが、小林秀雄の文章を通して、知力と思考力の結集した創造することの喜びを味わうことができる>と記述しました。

また、<特許担当者として、いい文章の特許明細書を書く上で大切なことは、いい文章を書こうとする意

著者連絡先: ☎ 599-0232 大阪府阪南市箱作 2874-238

e-mail: jacuv25648@yahoo.co.jp

欲を持って、地道な努力により、発明の本質に迫り、技術的知識及び技術的用語を駆使して正確で明瞭な文章を構築することに努め、知力と思考力を結集し表現することの喜びを味あうことにある」と記述しています。

筆者は前述の、「何故か判らないが」の何故かを探るために、再度、小林秀雄の作品を読んで、文章を書く上でのさらなるヒントを見つけようと思いました。

2. 小林秀雄の作品 第五次「小林秀雄全集」第一巻～第十四巻

第一巻 様々な意匠・ランボオ (1922-1930)

第二巻 X への手紙 (1931-1933)

第三巻 私小説論 (1934-1935)

第四巻 作家の顔 (1936)

第五巻 文芸批評の行方 (1937-1938)

第六巻 ドフトエフスキーの生活 (1939)

第七巻 歴史と文学・無常といふ事 (1940-1945)

第八巻 モーツァルト (1946-1948)

第九巻 私の人生観 (1949-1950)

第十巻 ゴッホの手紙 (1951-1953)

第十一巻 近代絵画 (1954-1958)

第十二巻 考えるヒント (1959-1963)

第十三巻 人間の建設 (1964-1976)

第十四巻 本居宣長 (1977-1982)

筆者は、これらの作品を読み漁ることにより作品の中で、「何故か」の糸口を感じるもの、感動したものを作品から引用して提示したいと思います。

【文章について】 1940年、小林秀雄 38歳

＜評論家がほんとうに困難を覚える処は、ただ理論の厳正を期するという事から一步を進め、理論が読者の心理にどういう効果を与えるか、その効果も併せ計って、評論の文章がただ理路の通った文章に止まらず、魅力ある生きた文章たることを期するという点にある。なかなか力及ばず其の所まで行けないものだが、そういう覚悟で評論を書かないと何時まで経っても評論に精彩が出ないのである。＞

【“実験的精神”】 1941年、小林秀雄 39歳

対談の中で小林の言葉に、＜論証するには論理でよいが、実証するには文章が要る。哲学というものを創るという技術は、建築家が建築するように、言葉というものを尽くす必要がある。それを言うのですよ。考えるとは、或は見るとは創ることだという命題は、ただディアレクテックではとけないのだと思う＞という文章がありました。

【私の人生観】 1949年、小林秀雄 47歳

＜思想のモデルを、決して外部に求めないと自分自身に誓った人、平和という様な空漠たる観念の為に働くのではない、働く事が平和なのであり、働く工夫から生きた平和の思想が生まれるのであると確信した人、そういう風に働いてみて、自分の精通している道こそ最も困難な道だと悟った人、そういう人々は隠れているが到るところにいるに違いない。私はそれを信じます。＞

【批評について】 1954年、小林秀雄 52歳

＜批評の主観的な面と客観的な面を引離してしまうのはやさしいのであるが、両者の相克のうちを進むという事が難しい。併しこれを進んでみなければ批評と創造との不即不離の所以を知る事は出来ない。＞

【常識】 1959年, 小林秀雄 57歳

＜機械は、人間が何億年もかかる計算を一日でやるだろうが、その計算とは反復運動に相違ないから、計算のうちに、ほんの少しでも、あれかこれかを判断し選択しなければならぬ要素が介入して来れば、機械は為すところを知るまい。これは常識である。常識は、計算することと考えることを混同してはいない。将棋は不完全な機械の姿を決して現してはいない。熟慮断行という全く人間的な活動の純粋な型を現している。＞

【無私 of 精神】 1960年, 小林秀雄 58歳

＜実行家として成功する人は、自己を押し通す人、強く自己を主張する人と見られ勝ちだが、実は、反対に、彼には一種の無私がある。空想は孤独でも出来るが、実行は社会的なものである。有能な実行家は、いつも自己主張より物の動きの方を尊重しているものだ。現実の新しい動きが看破されれば、直ちに古い解釈や知識を捨てる用意のある人だ。物の動きに順じて自己を日に新たにするとはい一種の無私である。批評の客観性というものも、この種の無私から発するものである。批評家の知恵は、科学者のものより、はるかに実行家の、或いは生活人の知恵に近い。理論の厳密より、行動の微妙を指す。＞

【批評】 1964年, 小林秀雄 62歳

＜自分の仕事の具体例を顧みると、批評文としてよく書かれているものは、皆他人への贅辞であって、他人への悪口で文を成したものは無い事に、はつきりと気付く。そこから率直に発言してみると、批評とは人をほめる特殊の技術だ、と言えそうだ。人をけなすのは批評家の持つ一技術ですらなく、批評精神に全く反する精神的態度である、と言えそうだ。＞

【常識について】 1964年, 小林秀雄 62歳

＜常識は、その本来の力を、決して大声は揚げないが、絶えず働かせているのだ。生活の知恵は、空想を好まず、真偽の判断を、事実に基づいて行うという点では、学問上の知恵と同じものだが、常に行動の要求にも応じているから、刻々に変わる現実の条件に従い、遲疑を許さぬ、確実な判断を、絶えず更新していなければならない。実生活は、私達に、そういう言わば行動するように考え、考えるように行動する知恵を要求して止まない。学問上の知識に、この生活のうちに訓練されている知恵に直接に働きかけ、これを指導するような力があるとは、先ず考えられない事だが、逆に、学問上の発見や発明には、この知恵の力が働かねばならぬ事は、十分に考えられる事だと思われます。＞

【“「本居宣長」をめぐって”】 1977年, 小林秀雄 75歳

対談の中で小林の言葉に、＜話が少々外れるが、私は若いころから、ベルグソンの影響を大変受けてきた。大体言葉というものの問題に初めて目を開かれたのもベルグソンなのです。それから後、いろいろな言語に関する本は読みましたけれども、最初はベルグソンだったのです。あの人の「物質と記憶」という著作は、あの人の本で一番大事で、一番読まれていない本だと言っていいが、その序文の中で、こういう事が言われている。自分の説くところは、徹底した二元論である。实在論も観念論も学問としては行き過ぎだ、と自分は思う。その点では、自分の哲学は常識の立場に立つと言っていい。常識は、实在論にも観念論にも偏しない、中間の道を歩いている。常識人は、哲学者の論争など知りほしくない。観念論や实在論が、存在と現象とを分離する以前の事物を見ているのだ。常識にとっては、対象は対象自体で存在し、而も私達に見えるがままの生き生きとした姿を自身備えている。これは「イマージュ」だが、それ自体で存在するイマージュだとベルグソンは言うのです。この常識人の見方は哲学的にも全く正しいと自分は考えるのだが、哲学者が存在と現

象とを分離してしまっただけで、この正しさを知識人に説く事が非常に難しい事になった。この困難を避けなかったところに自分の哲学の難解が現れて来る。また世人の誤解も生ずる事になる、と彼は言うのです。

ところで、この「イメージ」という言葉を「映像」と現代語に訳しても、どうもしっくりしないのだな。宣長も使っている「かたち」という古い言葉の方が、余程しっくりとするのだな。

「古事記伝」になると、訳はもっと正確になります。性質情状と書いて、「アルカタチ」とかなを振ってある。「物」に「性質情状」です。これが「イメージ」の正訳です。大分前に、ははア、これだと思った事がある。ベルグソンは、「イメージ」という言葉で、主観的でもなければ、客観的でもない純粹直接的な知覚経験を考えていたのです。更にこの知覚の拡大とか深化とか言っているものが、現実に行われている事を、芸術家の表現の上に見ていた。宣長が見た神話の世界も、まさしくそういう「かたち」の知覚の、今日の人々には思いも及ばぬほど深化された体験だったのだ。この純粹な知覚経験の上に払われた、無私な、芸術家によって行われる努力を、宣長は神話の世界に見ていた。私はそう思った。「古事記伝」には、ベルグソンが行った哲学の革新を思わせるものがあるのですよ。私達を取りかこんでいる物のあるがままの「かたち」を、どこまでも追うという学問の道、ベルグソンの所謂「イメージ」と一体となる「ヴィジョン」を掴む道は開けているのだ>という文章がありました。

上記に記載したこれらの内容は小林秀雄の作品から、一部分を抜粋したものであります。

3. 小林秀雄の作品を読んでみて

今回、再度、小林秀雄の作品を読んでみて、小林秀雄の文章は、文芸作品、絵画、音楽、骨董という対象物に対して、深い愛をもって、自らの直感と感性、理性をフルに働かせ、充実した心の動きを結集し、それを繰り返して、磨き、捻出された文章であると理解するに至りました。

そして、“何故か判らないが”と書いた、その「何故」かは小林秀雄の“無類の構想力”ではないかと思うようになりました。この様な無類の構想力で書かれた、小林秀雄の作品が、より良い特許明細書を書く上で、多くのヒントを与えてくれると思います。

おわりに

以上、より良い特許明細書を求めて(パート2)という拙い内容であったと思いますが、小林秀雄の作品を読むことによって、特許明細書を書く上での文章表現がさらに充実したものとなることを期待します。そして、特許明細書以外の文章を書く上でも、小林秀雄の作品は多分に参考になると思います。

今後、食品関連の開発者、特許関係者の方々に少しでも参考になればという想いもあり、本稿に対しての忌憚のないご意見をいただければ幸甚であります。

参考文献

1. 宮部正明：より良い特許明細書を求めて *New Food Industry*, **54**(5): 50-56, 2012.
2. 宮部正明：いい文章の特許明細書を求めて *New Food Industry*, **56**(11): 78-84, 2014.



ポスト・コロナ時代の国際交流の在り方について —日本医療科学大学における関連プログラムの展望—

新藤 洋子 (SHINDO Yoko)*

Key Words: 国際交流, ポスト・コロナ, オンライン交流, 海外研修, 医療系大学

International exchange programs in the post-Covid age: Perspective on the related programs at NIMS

*Correspondence author: Yoko Shindo¹

Affiliated institution

¹Nihon Institute of Medical Science [1276 Shimogawara, Moroyama-machi, Iruma-gun, Saitama, 350-0435 Japan.]

Abstract

Nihon Institute of Medical Science (NIMS) fosters medical professionals at five departments, department of radiological technology, department of rehabilitation, department of nursing, department of clinical engineering and department of clinical laboratory science. NIMS has offered students a variety of international exchange programs. However, due to the outbreak of COVID-19, it became difficult for the students to actually go abroad. Therefore, we developed online programs in which our students and faculty members can interact with their counterparts in Vietnam and Taiwan. This paper will firstly provide an overview of the international exchange programs at NIMS including the recent online events and then consider the future direction of those activities.

はじめに

日本医療科学大学 (Nihon Institute of Medical Science;NIMS) は、診療放射線学科, リハビリテーション学科 (理学療法専攻および作業療法専攻), 看護学科, 臨床工学科, 臨床検査学科の5学科を有する大学である。2007年の開学以来, 日本の医療現場で活躍する専門家を, 数多く輩出してきた。NIMSでは, 高度な専門知識と技術の習得に加えて, 豊かな人間性を育むことも重視している。さらに, 医療のグローバル化に合わせて, 国際交流プログラムを数多く実施してきた。それらのプログラムを通じて, 世界を舞台に活躍できる医療人の育成を目指している。しかし, 2020年からはじまった新型コロナの感染拡大の影響によって, 現在も, 海外研修が実施できないという状況が続いている。そこで, NIMSでは, 海外の協定校とのオンラインでの交流を行った。オンラインでの交流は, これまでのプログラムの実績に基づいて, 企画されたものである。そして, コロナ禍が収束したあとの国際交流は, オンラインでの国際交流の経験

* 日本医療科学大学 国際交流研究センター
〒350-0435 埼玉県入間郡毛呂山町下川原 1276

を踏まえたものになるであろう。本稿では、現在に至るまでの活動を振り返りながら、ポスト・コロナの国際交流の在り方について考察する。

1. オレゴン研修プログラム

日本医療科学大学の国際交流プログラムのなかで、もっとも代表的なものは、2012年から実施しているオレゴン研修プログラムである。研修先となるオレゴン州のポートランドは、筆者自身が、高校生と大学生の時期を合わせて、留学生として、5年近く過ごした場所である。その現地での滞在経験と人脈を生かして、筆者自身が、研修プログラムの立ち上げに携わった。2012年から2019年の8年間で、合計293名の学生がオレゴン研修に参加している（うち16名は、シアトル研修の参加者）。

オレゴン研修の主な内容は、医療・福祉の分野で活躍するスペシャリストによる講義、医療機関の視察、NPO法人の訪問、ボランティア活動、ドラゴン・ボート体験、現地の大学生との交流などである（写真1）。



写真1 オレゴン研修（上段：プロビデンス・ポートランド医療センター，中段：ボランティア活動とドラゴン・ボート体験，下段：セントラル・オレゴン）

それらの活動を通じて、学生は、最先端の医療設備、日本と米国における医療体制や保険制度の違い、NPO法人の役割などについて学ぶことができる。そのような知識は、医療のグローバル化や高齢者の増加など、現在の日本が直面している課題について考えるうえで必要不可欠なものである。

また、オレゴン研修では、学生が、Meals on Wheels People という団体が行っているボランティア活動にも参加することができる¹⁾。Meals on Wheels People は、マルトノマ郡（オレゴン州）、ワシントン郡（オレゴン州）およびクラーク郡（ワシントン州）在住の60歳以上の高齢者にランチを宅配するサービスを実施している。また、同じ地域で、30のダイニング・センターを運営している。高齢者は、そのダイニング・センターでも、ランチを食べることができる。ランチの金額は、基本的に「支払える分だけ」となっている。

Meals on Wheels People の使命は、ランチの提供を通じて、高齢者が、社会から孤立することを防ぐことである。実際の研修では、学生は、セントラル・キッチンを見学したあと、グループに分かれて、ランチの宅配の補助やダイニング・センターでの配膳・後片付けなどを行っている。海外で、ボランティア活動に参加するという経験は、学生にとって貴重なものである。ボランティア・スタッフや高齢者との交流を通じて、現地の状況を肌で感じる機会となっている。

もう1つ体験学習として、毎年、オレゴン研修のプログラムに組み込んでいるのが、ドラゴン・ボートである。ドラゴン・ボートには、乳がんサバイバーが、質の高い生活（Quality of Life）を維持するうえで、多くの肉体的および精神的メリットがあることが知られている。オレゴン研修では、乳がんサバイバーとサポートメンバーで構成されるチームに混じって、ドラゴン・ボートを実際に漕がせていただくことができる。その後、学生は、チームのメンバーと昼食を取りながら、話することができる。

近年では、現地の大学を訪問する機会も多くなってきている。これまで訪問した大学は、パシフィック大学（2011年）、コンコルディア大学（2016年、2017年）、ワーナー・パシフィック大学（2018年、2019年）、ポートランド州立大学（2019年）である。それらの大学訪問を通じて、米国における最先端の研究や教育についての知見を得ることができる。また、現地の大学生とレクリエーションなどを通じて、交流を深めることができる。

2017年までは、ホテルを宿泊先に選んでいたが、2018年からは、ポートランド州立大学の寮に宿泊している。それによって、学生は、現地の大学生になったような感覚で、研修プログラムに参加できるようになった。さらに、大学の寮の宿泊費は、ホテルの宿泊費よりも安価であるため、全体のプログラム費用を抑えたまま、滞在日数を伸ばすことに成功している。研修プログラムの滞在日数は、2017年まで5泊7日であったが、2018年以降は、8泊10日になっている。

オレゴン研修プログラムの参加者は、例年、30名から40名ほどであるが、2019年は、46名という過去最多の参加者が集まった。プログラムの性質上、40名以上の参加者を受け入れることが困難であったため、2019年は、診療放射線学科、看護学科、臨床工学科の学生（30名）が、通常のオレゴン研修プログラムに参加し、リハビリテーション学科の学生（16名）は、シアトルで同等の研修が受けられるように、新たなプログラムを立ち上げるようになった。シアトル研修でも、学生は、専門家による講義や医療機関の視察を通じて、米国における医療制度、医療に対する考え方、医療ビジネスの仕組みなどについて学ぶことができた。

さらに、シアトル研修は、リハビリテーション学科の学生が対象ということで、実際の献体を用いた解剖実習もプログラムに組み入れることにした。学生は、本物の内臓、神経、筋肉、骨に触れることで、大きさや重さ、位置など、教科書では分かりづらい部分も理解できたようである。さらに、シアトル・マリナーズに帯同している日本人トレーナー（理学療法士）にも講義をしていただく機会を得た。世界で活躍するリハビリテーションの専門家の話を聞いて、学生たちは、非常に刺激を受けていたようである。

2. 海外の協定校との交流

NIMS は、2015年から2016年にかけて、アジア地域にある4つの大学と学術協定を結び、学生および教職員のあいだでの交流を促進してきた。2015年10月には中臺科技大學（台湾）、2015年12月にはドンナイ



写真2 2019年ベトナム研修

技術大学（ベトナム）、2016年2月にはフィリピン・アドベンティスト大学（フィリピン）およびマニラ・アドベンティスト大学（フィリピン）と学術協定を締結した。それらの大学との交流を通じて、学生が、各国における医療事情、社会や文化、生活習慣の違いなどについて学ぶ機会を提供している²⁻⁵⁾。

NIMSの学生が、中臺科技大學を訪問するときには、台湾で開催される学会発表と組み合わせることが多い。2016年から2019年にかけて、NIMSの診療放射線学科の学生が、中華民國医事放射学会学術大会（第49～52回）で発表を行った。2018年には、看護学科の学生が、第10回国際学術研究会で発表を行った。それらの学会発表に合わせて、中臺科技大學を訪れて、講義の聴講やキャンパス内の施設見学などを行った。現地の学生にナイトマーケットを案内してもらうなど、学生同士の交流も盛んに行われている。

中臺科技大學からのインバウンドとしては、2017年と2019年に大学院生が、NIMSを訪れている。2019年からは、新たに短期交換留学プログラムを立ちあげた。その第一陣として、中臺科技大學およびその系列校である新生醫護管理專科學校の学生、合計で6名が、教員1名とともにNIMSを訪れた。10日間の短期交換留学プログラムの主な内容は、NIMSの各学科・専攻の教員による講義、実習、実験、キャンパス・ツアーなどの学内イベントの他、近隣の医療・福祉関連施設の訪問である。休日には、NIMSの学生とショッピングも楽しんでいたようである。

ドンナイ技術大学との交流では、2016年にアウトバウンドとして、2名の学生と4名の教職員が現地を訪れた。双方の教職員のあいだでの議論や学生同士の交流を通じて、新しい海外研修プログラムを立ち上げることが合意された。2019年、その研修プログラムの第一陣として、4名の教職員と18名の学生が、ドンナイ技術大学を訪れた（写真2）。研修プログラムの主な内容は、現地の大学での講義、双方の大学教員による研究発表会、現地の医療・関連施設の視察、学生同士の文化交流などである。

インバウンドとしては、ベトナムと日本の物価があまりに違うため、ドンナイ技術大学の学生にとっては、日本に来るための費用を負担するのが難しいという状況があった。そこで、「さくらサイエンスプログラム」を活用して、ドンナイ技術大学の教職員および学生を招聘する手続きを進めた。「さくらサイエンスプログ

ラム」は、科学技術振興機構が行っている国際青少年サイエンス交流事業である。2020年度、NIMSの交流計画は、見事、本事業で採択されたが、新型コロナの感染拡大によって、実施が見送られることになった。

フィリピン・アドベンティスト大学およびマニラ・アドベンティスト大学との交流では、アウトバウンドとして、教職員の派遣は行ったものの、学生の派遣には至っていない。何度か、新しい研修プログラムの立ち上げを試みたが、政権交代による治安の悪化や火山の噴火などによって、実施が困難になるという状況が続いていた。インバウンドとしても、2016年にマニラ・アドベンティスト大学の教職員がNIMSを訪問して以来、その後の訪問は実現していない。

フィリピンでは、小学校から大学まで、英語で授業が行われているため、大学の教職員や学生は、極めて高い英語力を持っている。NIMSの学生が、フィリピンの2つの大学の教職員や学生と交流し、英語のシャワーを浴びれば、英語によるコミュニケーション能力が飛躍的に向上するであろう。ゆえに、新型コロナウイルスの感染拡大が収束したあと、現地の状況を見極めながら、学生を派遣するためのプログラムを立ち上げていきたいと考えている。また、インバウンドをより活発に行うための方法も引き続き模索していきたい。

3. コロナ禍での国際交流プログラム

2020年度のオレゴン研修プログラムには、例年通り、多くの学生が参加することが予想されていた。また、2020年度は、「さくらサイエンスプログラム」を通じて、ドンナイ技術大学の学生および教職員を招聘することになっていた。中臺科技大學との短期交換留学プログラムでは、1年ごとに交代で、学生の派遣を行うことになっているので、2020年度は、NIMSの学生が台湾に行くことになっていた。しかし、新型コロナウイルスの感染拡大によって、海外との往来が困難な状況になった。

どのような状況であっても、学生が、国際交流の機会を完全に失うということがあってはならない。そのような思いから、海外の協定校とのオンラインでの交流を企画することになった。まず、国際看護論の授業のなかで、ドンナイ技術大学の学生とZOOMを使ったオンライン交流を行った。NIMSからの参加者は、科



写真3 2020年中臺科技大學とのオンライン交流

目を履修している看護学科の4年生52名である。ドンナイ技術大学からは、看護学科と臨床検査学科の学生33名が参加した。学生は、それぞれ母国語で話すことになっていたため、通訳の手配も行った。

オンライン交流の内容としては、まず、双方の学生が、パワーポイントを使って、コロナ禍での大学生活や感染予防策について発表を行った。NIMSの学生からは、検温や手指のアルコール消毒など学内での感染予防策について発表が行われた。また、病院実習の代わりに学内実習を行っているという報告もあった。他方、ドンナイ技術大学の学生からは、ソーシャルディスタンスの確保やマスクの再利用禁止など学内ルールについて説明があった。実習先の病院での感染予防策についても言及があった。

もう1つのオンライン交流として、中臺科技大学の学生と4日間にわたって文化交流を行った(写真3)。NIMSからは4日間で合計27名の学生と、9名の教職員が参加した。中臺科技大学からは、合計で24名の学生と6名の教職員が参加した。どちらの大学からも学長自らが参加し、国際交流を重視する姿勢が示される形となった。台湾では、キャンパス内でのZOOMの使用が禁止されているため、Facebookを使った交流となった。双方の学生が、自分の国で流行している音楽やアニメ、観光スポット、お祭り、食べ物などの紹介を行った。使用言語は、英語である。

NIMSの学生は、それぞれパワーポイントを使用して発表を行った。英語があまりうまく話せなくても、パワーポイントのスライドに英語で要点がまとめられているので、中臺科技大学の学生にも、うまく発表内容が伝わっていたようである。両国におけるコロナの状況についても情報交換が行われた。台湾は、世界でもっともコロナの封じ込めに成功した国として知られている。今回の交流会では、マスクの在庫が分かるアプリの導入など、台湾における成功事例について、直接、教職員や学生から話を聞くことができた。

4. ポスト・コロナの国際交流

現在、日本でも、ワクチン接種が進みはじめているが、いつ頃、新型コロナの感染拡大が収束するのかという目途は、未だ立っていない。しかし、いずれは、かつてのように国際交流が盛んに行われる日が戻ってくるであろう。それを念頭に、今回のようなオンラインでの国際交流の経験を踏まえて、今後の海外研修プログラムが、どうあるべきかを考えることは有益であろう。まず、今回のオンラインでの国際交流を通じて、知識の習得や共有という部分は、ある程度、オンラインでも代替可能であることが分かった。

学術的な交流だけが目的であれば、オンラインでも十分なところがある。そのような学術的な交流の頻度を高めたいのであれば、オンラインの活用が有効であろう。また、オンラインの国際交流に参加した学生の多くから、海外に行きたい気持ちが高まったという意見もあがっている。学生のモチベーションを高めるという意味でも、オンラインでの国際交流を引きつづき、併用するのが望ましいであろう。さらに、費用面で海外に行くことが難しいという学生にとっては、オンラインでの交流が、貴重な経験になりうる。

しかし、一方で、オンラインでの交流が、現地での研修プログラムに取って代わるようなものではないということが明らかとなった。日本では見られないような壮大な景色を見たり、現地での活動に参加したり、地元の大学生とナイトマーケットで買い物をしたりと、海外に行かなければできないことは多くある。そのような現地での経験が重要であるとするならば、これまでにNIMSが行ってきた国際交流プログラムは、非常に理にかなったものであったといえる。今後の方向性としても、引き続き、体験型のものを多く取り入れることが重要になる。

おわりに

新型コロナの感染拡大によって、海外に行くことが、ほとんどできないという状況になった。その分、オンラインでの海外との繋がりや、強くなってきたと感じている。そのような変化は、新型コロナが落ち着いたあと、消えて無くなるわけではない。これからの社会では、オンラインが活用される機会がもっと増えていくであろう。また、技術的な部分でも、「オンラインで出来ること」が多くなっていくであろう。学生は、そのような社会の中で生きていかなければならない。ゆえに、大学としても積極的にオンラインを活用する

取り組みが、引き続き、重要となる。しかし、オンラインの利用が、広がれば、広がるほど、実際の体験そのものの価値も高まっていくと思われる。実際に海外に行くことで、それまでとは、まったく違う視点で物事を考えられるようになることもある。例えば、他の国で生活することによって、日本の良さを再発見することもあるだろう。また、困難な体験をすることで、問題解決能力が高まるといった効果も期待できる。そのような実体験を通じてのみ得られるものの価値を学生に教えていくということが、これからの教育の役割の1つではないかと考えている。

参考文献

1. Meals on Wheels People <https://www.mowp.org/>
2. 中臺科技大學 <https://www.ctust.edu.tw/>
3. ドンナイ技術大学 <https://dntu.edu.vn/>
4. フィリピン・アドベンティスト大学 <http://web1.aup.edu.ph/>
5. マニラ・アドベンティスト大学 <http://mac.edu.ph/>

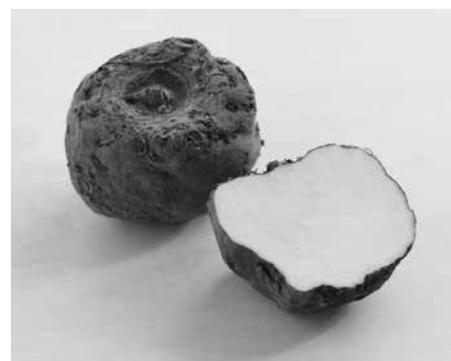
こんにゃく由来セラミドのヒト脳内アミロイドβ蓄積抑制効果を検証 アルツハイマー病などによる認知機能低下の抑制に期待！

—第75回日本栄養・食糧学会大会にて発表—

株式会社ダイセル(本社:大阪市北区)は、北海道大学(北海道札幌市)および北海道情報大学(北海道江別市)との共同研究により、当社が開発した健康食品素材であるこんにゃく由来グルコシルセラミドの摂取がヒト脳内アミロイドβ蓄積を予防し、アルツハイマー病などによる認知機能の低下を抑制・維持できる可能性があることを確認いたしました。なお、今回の研究成果は、2021年7月3日(土)～4日(日)に開催された「第75回日本栄養・食糧学会大会」(一般演題B-23)にて発表いたしました。

■研究の背景・目的

アルツハイマー病などの認知機能の低下を引き起こす進行性の疾患は、アミロイドβと呼ばれるタンパク質が脳細胞外に蓄積することが原因と言われています。これまでの研究では、こんにゃく由来グルコシルセラミドをアルツハイマー病モデルマウスに経口投与することで、アミロイドβクリアランス効果を保持する神経由来エクソソームが増加し、脳内アミロイドβ蓄積が抑制されることが明らかになっていました。そしてこのたび、ヒトが経口摂取した場合での効果を検証するため、北海道大学および北海道情報大学との共同研究においてプラセボ対照ランダム化二重盲検試験を実施いたしました。



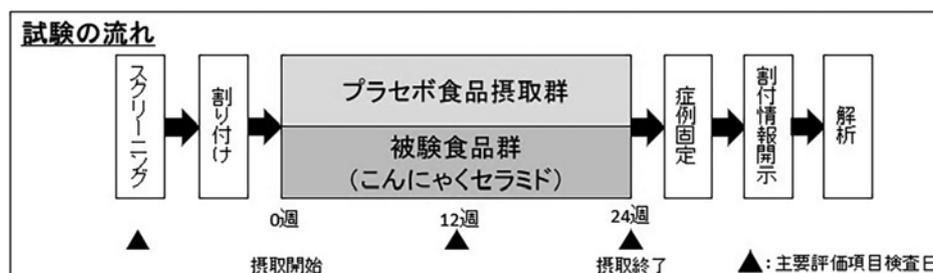
こんにゃく芋イメージ

なお、本研究に用いたこんにゃく由来グルコシルセラミドは、皮膚の保湿・バリア機能を高める機能性食品素材として販売している原料で、板こんにゃくの製造時に廃棄される「飛び粉」から抽出製造するサステナブルな原料です。

グルコシルセラミドは、多くの植物に含まれていますが、小麦胚芽や米ぬかなどに比べ、こんにゃく芋の飛び粉抽出物はセラミド含有量が高いことがわかっています。

■研究の内容と結果

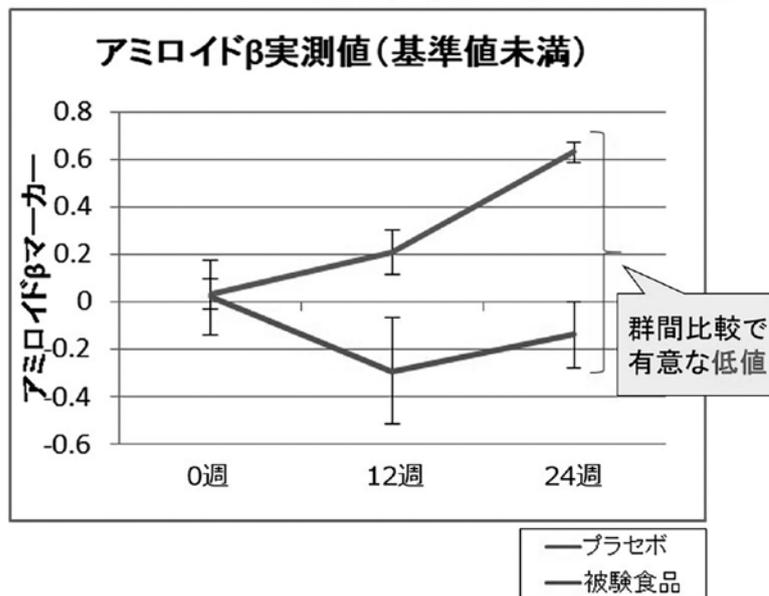
試験期間を24週間とし、60歳以上80歳未満の被験者20名(平均70.1歳)をプラセボ食品群10名と被験食品群10名に構成し、プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験を行いました。



試験の流れ

それぞれの群にプラセボ食品またこんにゃく由来グルコシルセラミド5.4mgを含む被験食品を摂取いただき、0週、12週、24週に血中アミロイドβバイオマーカー値の測定を実施したところ、被験食品群において、

■ 試験結果 (層別解析…血中アミロイドβマーカが低い集団)



変化量有意差グラフ

0週目との比較で12週目に有意な低値を示しました。さらに層別解析を行ったところ、アミロイドβバイオマーカー値が相対的に低めの集団においては、摂取12週後、24週後において被験食品群の変化量がプラセボ食品群より有意に低値を示しました。

■今後の研究開発について

今後、さらなるヒト介入試験を進め、認知機能分野における機能性素材の開発に取り組み、人々の健康長寿に役立つ製品を提供してまいります。

【本件に関するお問い合わせ先】

株式会社ダイセル ヘルスケア SBU 事業推進室 事業戦略グループ

担当：稲井田

TEL：03-6711-8213

Mail: healthcare_info@jp.daicel.com

東栄新薬がアガリクス KA21 摂取によるアッカーマンシア菌増殖の特許を出願、肥満改善・糖尿病の治療・がん免疫療法などに有用

東栄新薬株式会社（所在地：東京都三鷹市、代表取締役：元井 章智）は、東京薬科大学薬学部免疫学教室と共同で行った、当社の露地栽培アガリクス KA21 株（以下、アガリクス KA21）に関する研究成果として、アガリクス KA21 摂取によるアッカーマンシア菌（アッカーマンシア・ムシニフィラ）の増殖促進作用を確認しました。今回、この研究成果を受けて「医療・美容に応用可能なアッカーマンシア・ムシニフィラ増殖促進用組成物およびこれを含む医薬、飲食品、飼料」として特許出願を行いましたことをご報告いたします。



露地栽培アガリクス KA21

■概要

特許出願番号：特願 2021-107016

提出日：2021（令和3）年6月28日

特許出願人：東栄新薬株式会社

発明の名称：医療・美容に応用可能なアッカーマンシア・ムシニフィラ増殖促進用組成物およびこれを含む医薬、飲食品、飼料

技術分野：本発明は、アッカーマンシア・ムシニフィラ増殖促進用組成物およびこれを含む医薬・飲食品、飼料に関する。具体的には、医薬は、例えば、肥満・メタボリックシンドローム改善用、糖尿病治療用、腸内抗炎症用、がん免疫療法の増強を目的としたがん治療用として有用であり、飲食品は、例えば、肥満・メタボリックシンドローム改善用、糖尿病治療用、腸内抗炎症用、美容用、痩身・ダイエット用として有用である。

■アッカーマンシア・ムシニフィラについて

アッカーマンシア・ムシニフィラ (*Akkermansia muciniphila*) は、0.6～1.0 μ m 程度の大きさを有し、芽胞を作らず、運動性を有さない偏性嫌気性のグラム陰性細菌であり、ヒトをはじめとする多くの哺乳動物の腸内に通常存在する真性細菌であることが知られています。

近年、アッカーマンシア・ムシニフィラは肥満や糖尿病の人の腸内においてはその量が減少していること、また、アッカーマンシア・ムシニフィラの投与によりマウスにおける脂肪増加の改善やインスリン抵抗性の改善が確認され、アッカーマンシア・ムシニフィラと肥満等の障害との関連性が指摘されています^{1,2)}。さらに、アッカーマンシア・ムシニフィラは、虫垂炎の重症度と反比例していること、また、潰瘍性大腸炎やクローン病等の炎症を伴う疾患の患者腸内においては、その量が減少していることが報告されておりアッカーマンシア・ムシニフィラは腸内の抗炎症作用に関与していると考えられています^{3,4)}。また、近年、抗悪性腫瘍剤の PD-1 阻害剤の作用を増強させる作用も指摘されています⁵⁾。

このため、これらの疾患や障害を予防又は改善するための有望な手段として、アッカーマンシア・ムシニ

フィラに対する関心が高まっています。

■アガリクスについて

アガリクスは、補完代替医療の分野で健康食品・サプリメントとして広く利用されている南米ブラジル原産のキノコ。「菌株、栽培条件や産地により、その特性や含有成分が異なる⁶⁾。」「アガリクス含有製品には、製品により品質に大きな違いがある⁶⁾」とされます。

■ブラジル産露地栽培アガリクス KA21 株 (アガリクス KA21)

アガリクスの原産地ブラジルの大自然の中、キング・アガリクス 21 (=KA21) 株を使用して、太陽の下、露地栽培されたアガリクス。暗所で栽培される通常のハウス栽培アガリクスに比べ、サイズは大きく育ち、主要成分のβ-グルカンやビタミンD⁷⁾ などが多いといった特徴があります。



左：露地栽培アガリクス
右：一般的なアガリクス (ハウス栽培)

■アガリクス研究 No.1 メーカー⁸⁾ = 東栄新薬株式会社

露地栽培アガリクス KA21 株のメーカーである東栄新薬株式会社は、これまでにアガリクス KA21 に関する研究開発を 25 年以上行い、国際論文発表数は 32 本とアガリクスメーカーの中でも最も多くの研究実績があります⁹⁾。麻布大学獣医学部、慶應義塾大学 SFC 研究所、国立長寿医療研究センター、順天堂大学医学部、東京大学食の安全研究センター、東京薬科大学薬学部免疫学教室などとの共同研究実績があり、露地栽培アガリクス KA21 に関する様々な有益なデータを発表しています。

参考資料

- 1) *Nature Medicine* **23**: 107-113, 2017.
- 2) *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 9066-9071, 2013.
- 3) *Gut*. **60**(1): 34-40, 2011.
- 4) *Am J Gastroenterol*. **105**(11): 2420-2428, 2010.
- 5) *Science* **359**: Issue 6371, 91-97, 2018.
- 6) 国立健康・栄養研究所「健康食品」の安全性・有効性情報ホームページより抜粋
<https://hfnet.nbiohn.go.jp/contents/detail75lite.html>
- 7) 日本食品分析センター調べ
- 8) 国際論文発表数に基づいています
- 9) 2021 年 5 月各社ホームページ・pubmed より (自社調べ)

【本件に関するお問い合わせ先】

東栄新薬株式会社 担当：元井 章智
TEL：0422-26-7310 FAX：0422-26-7230
Mail: akitomo-motoi@toeishinyaku.com
URL：https://www.toeishinyaku.com/

好評発売中

- A5版 / 248ページ
- 定価：(本体 3,500円+ 税)
- 発行：食品資材研究会



■ 著者 / 山口 正義 (やまぐち まさよし)

骨の健康と食因子

骨粗鬆症の予防と修復へのアプローチ

- 第1章 ホルモンと生体機能調節
- 第2章 ホルモンの細胞内への情報伝達とそのしくみ
- 第3章 カルシウム代謝とそのホルモン調節
- 第4章 骨代謝とそのホルモン調節
- 第5章 老化と骨カルシウムホメオスタシス
- 第6章 栄養性ミネラルと骨粗鬆症の予防
- 第7章 生体微量元素と骨粗鬆症の予防
- 第8章 骨粗鬆症を予防する食品由来生理活性因子
- 第9章 骨粗鬆症を予防する食品素材
- 第10章 複合食因子の骨効果と新規サプリメントの開発

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

www.newfoodindustry.com

ニューフードインダストリー 第63巻 第8号

印刷 令和 3 年 7 月 20 日
発行 令和 3 年 8 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 〇一九店 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 89591-8



4910895910819
02500