

青大豆の抗アレルギー、抗炎症作用の解析と機能性食品素材開発への展望



静岡県立大学大学院生活健康科学研究科
日清製粉グループ高次機能性食品探索研究室
今井伸二郎

大豆の機能性成分と主な効果

成分	提唱されている効果
イソフラボン	癌化抑制、癌細胞増殖抑制、骨粗鬆症緩和、更年期障害緩和
サポニン	抗酸化作用、癌細胞増殖抑制
ビタミン類	成長促進作用、抗酸化作用
フィチン酸	癌化抑制
アントシアニン	抗酸化作用
タンパク(ペプチド)	血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制、抗酸化作用、抗肥満
脂質	HDL増加促進、脂質代謝改善、脳機能改善

研究の背景と目的

背景:

大豆はアレルギーとしての側面が重視され、オリゴ糖等の活性が報告されているだけで、抗アレルギーに着目した研究はあまりなされていない。

目的:

大豆を中心に雑穀・豆類を対象にした、新規抗アレルギー機能性食品素材を探索する。

研究概要

- 雑穀・豆類に関する新たな機能性を評価するためエタノール抽出物ライブラリーを作成。
- IFN- γ プロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだT細胞様株を用い、IFN- γ 亢進活性評価法を作出した。
- ライブラリーを評価したところ青大豆に活性が確認された。

青大豆に着目し更なる研究を開始

青大豆概要

青大豆は、外皮、子葉部の色から2種類に分類。
 “外皮・子葉ともに緑色” or “外皮のみ緑色、子葉は黄色”
 胚芽も白、黄、黒、暗褐色等がある。

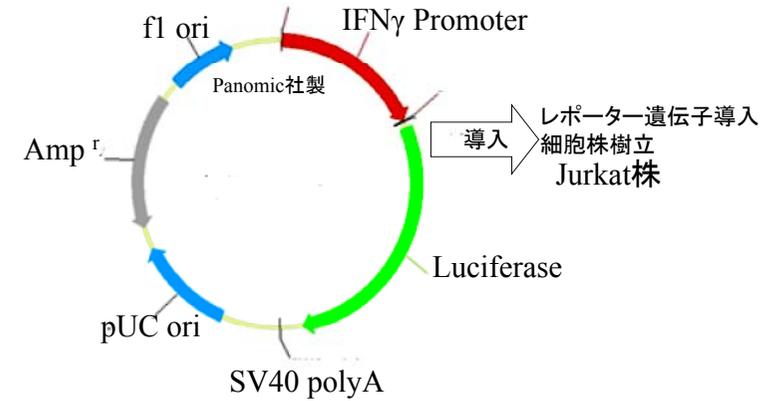


左から
 黄大豆(フクユタカ)
 青大豆(エチゴミドリ)
 中国産青大豆
 モンゴル産青大豆)

	イソフラボン	サポニン	スタキオース (オリゴ糖)	総クロロフィル	カロテン
青大豆 エチゴミドリ	0.36g	0.43g	3.78g	4.0mg	140μg
黄大豆 フクユタカ	0.22g	0.31g	3.14g	-	4μg

IFN-γレポーター遺伝子アッセイ

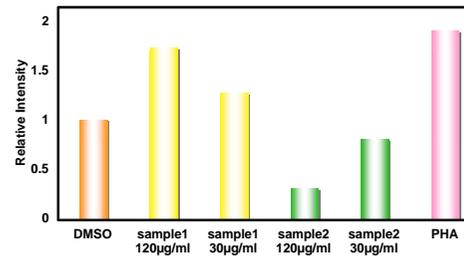
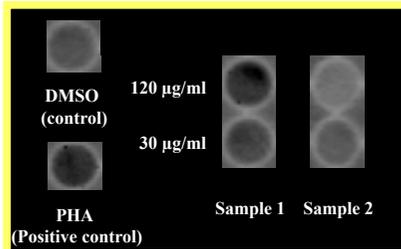
IFN-γプロモーター領域にLuciferase遺伝子を組み込んだプラスミドをヒトT細胞様株Jurkat細胞に遺伝子導入し、レポーターアッセイ法によるスクリーニングを実施した。



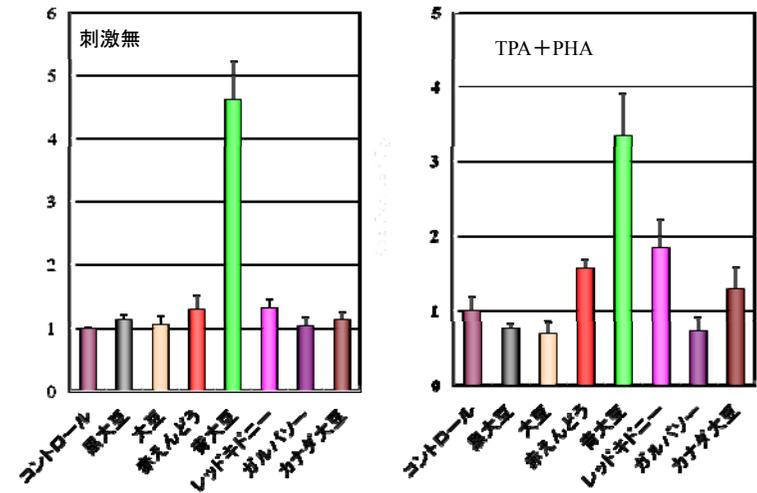
IFN-γプロモーター活性を指標とした探索

・実験方法

- 細胞を測定用の96wellプレートに播種 (1.5 x 10⁴ cells / well)
- ↓
- サンプルの添加 (終濃度30 μg/ml, 120 μg/mlおよびDMSO)
- ↓
- CO₂インキュベーター内で培養 (20hr)
- ↓
- 細胞溶解剤および発光基質の添加
- ↓
- ルミノメーターによる発光量測定



各種大豆のIFN-γ遺伝子発現増強活性



青大豆抽出物にのみIFN-γ遺伝子発現増強活性確認

Th1、2 *in vitro* 評価系

Th1 (IFN- γ)

Jurkat E細胞(2 x 10⁶ cells/ml) をプレートに播種

食品サンプル添加 (final conc. 30 μ g/ml) および刺激物質 (PHA 2.5 μ g/ml, TPA 5 ng/ml) 添加

CO₂インキュベーター内で培養 (48hr)

ELISA & Real-Time PCRにより測定

Th2 (IL-4)

マウス (Balb/c) より脾臓摘出後、脾臓細胞懸濁液を調製

2 x 10⁶ cells/ml に調製し、プレートに播種

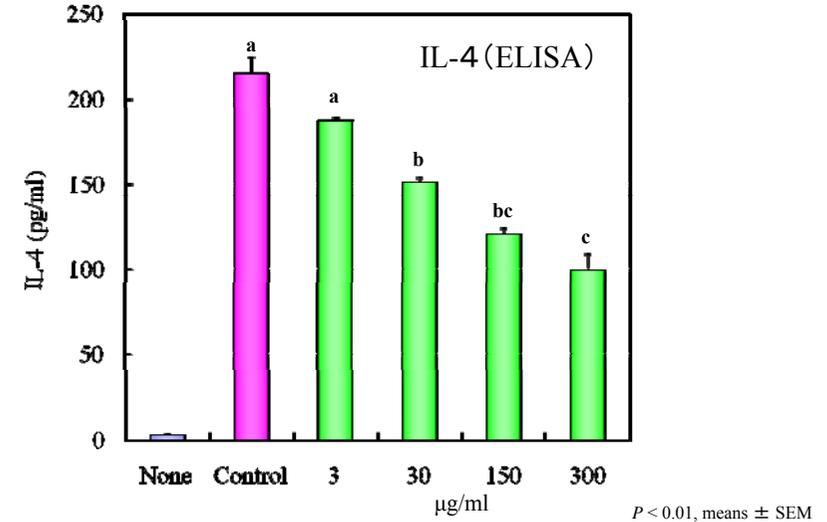
食品サンプル添加 (final conc. 30 μ g/ml) および TPA (0.5ng/ml) & A23187 (0.5 μ M) による刺激

CO₂インキュベーター内で培養 (20hr)

ELISAにより測定

青大豆抽出物はIL-4を濃度依存的に抑制

青大豆をEtOH抽出したサンプルを使用



エチゴミドリの抽出画別活性

青大豆抽出法

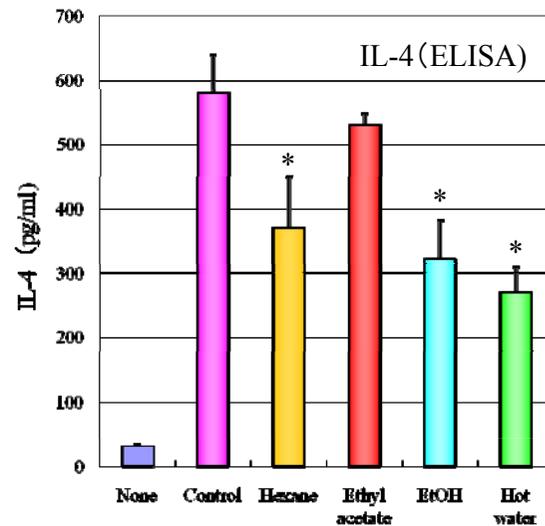
エチゴミドリ粉砕品

↓
ヘキサン抽出

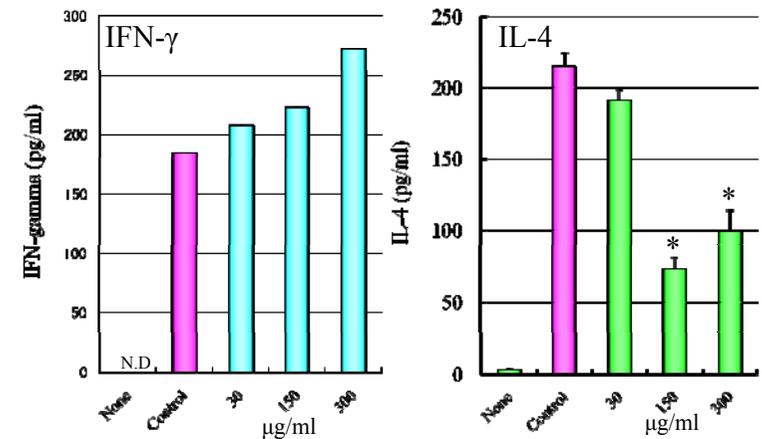
↓
酢酸エチル抽出

↓
エタノール抽出

↓
熱水 (95°C) 抽出

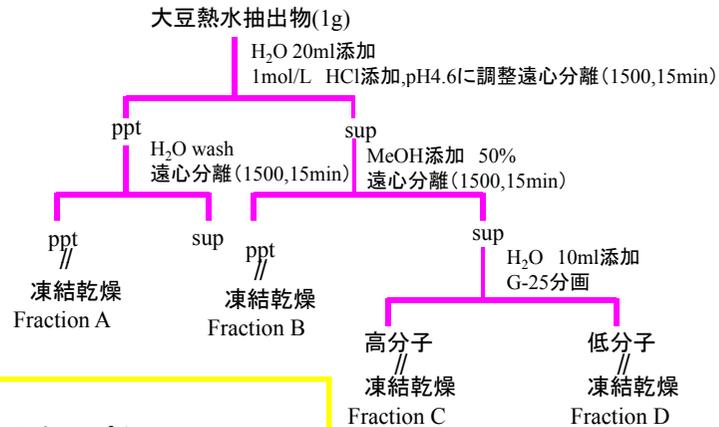


エチゴミドリ熱水抽出物の活性



熱水抽出物はIFN- γ 産生を増強、IL-4産生を抑制する

エチゴミドリ熱水抽出物分画スキーム

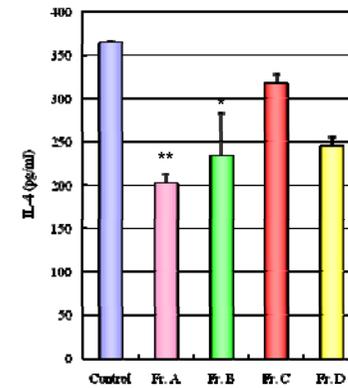


主要成分

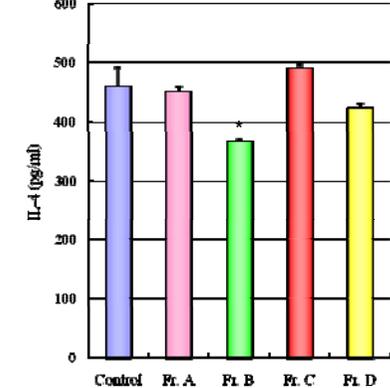
- Fr.A; 高分子のタンパク
- Fr.B; 多糖類
- Fr.C; ペプチド及びオリゴ糖(高分子)
- Fr.D; ペプチド及びオリゴ糖(低分子)

熱水抽出物フラクション別の活性

エチゴミドリ (青大豆)



フクユタカ (黄大豆)



主要成分

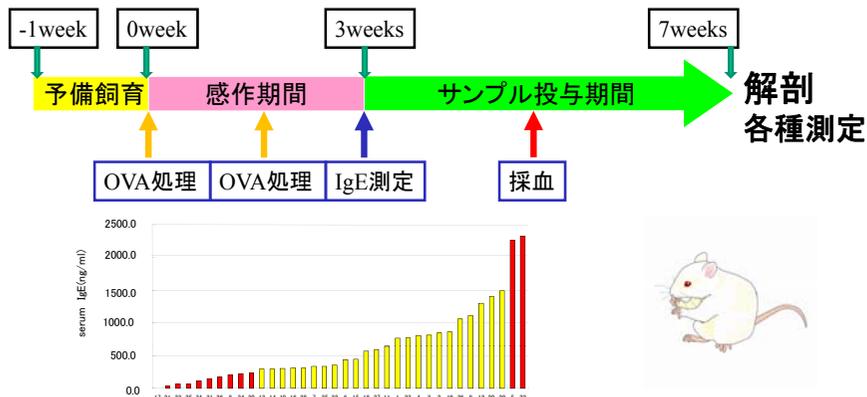
- Fr.A; 高分子のタンパク
- Fr.B; 多糖類
- Fr.C; ペプチド及びオリゴ糖(高分子)
- Fr.D; ペプチド及びオリゴ糖(低分子)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs. control), means \pm SEM

含有量に則した濃度で試験
(Fr. A 150 μ g/ml, Fr. B 24 μ g/ml,
Fr. C 22 μ g/ml, Fr. D 144 μ g/ml)

in vivo 試験概要 (共通項目)

- 試験動物: Balb/c ♂5week
- 投与方法: AIN-76に5%混餌
- 試験匹数: 36匹 OVA感作後24匹をIgEにて群分け
- OVA処理内容: OVA 1 μ g/head アジュバントAl(OH)₃ 2mg/headを腹腔投与
- 測定項目: 血清OVA特異的IgE・脾臓細胞培養上清・MLN IL-12b IFN- γ IL-4

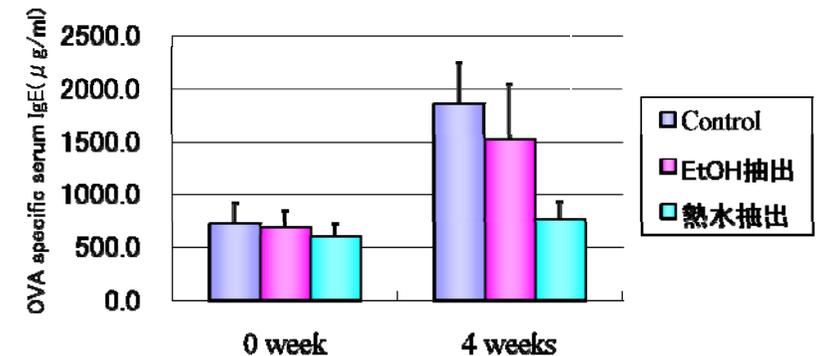


試験① 青大豆の抽出方法による影響

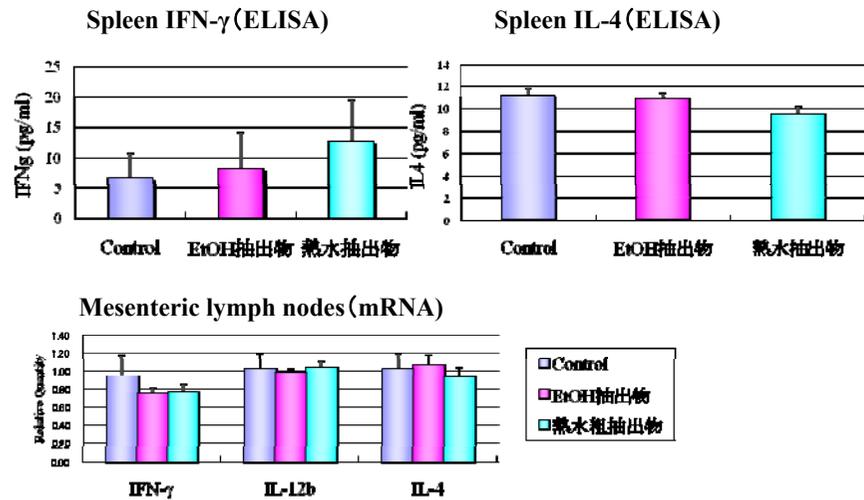
EtOH抽出物: 全粒青大豆を粉砕し、10倍量のEtOHで24時間抽出し、濃縮乾固
熱水抽出物: 全粒青大豆を10倍量熱水(95 $^{\circ}$ C)にて1時間加熱抽出し、凍結乾燥

OVA特異的血清IgEの変化

$P < 0.05$



試験結果① 青大豆の抽出方法による影響 Th1/Th2への影響



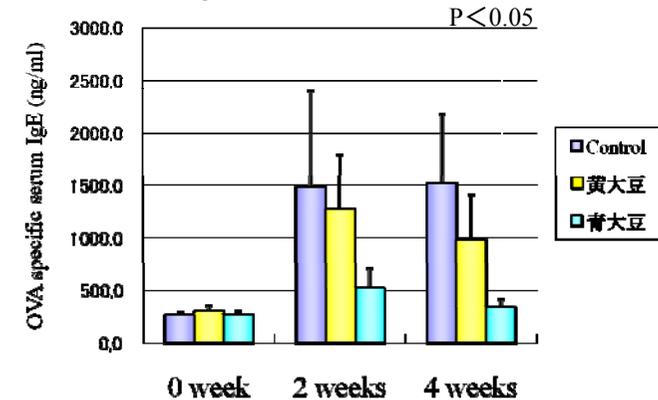
試験結果② 青大豆と黄大豆の比較

黄大豆 愛知県産フクユタカ

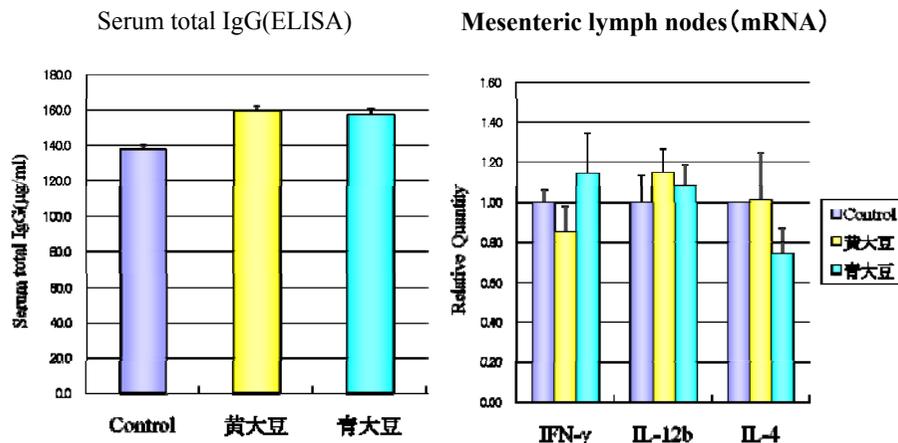
青大豆 山形県産エチゴミドリ

上記の2種を熱水抽出(95°C,1hour)したものを飼料に混合

OVA特異的血清IgEの変化



試験結果② 青大豆と黄大豆の比較



試験結果③ 部位別の比較

種皮(8%)



種皮: 主な成分は繊維

胚芽: イソフラボン、サポニンを多く含む

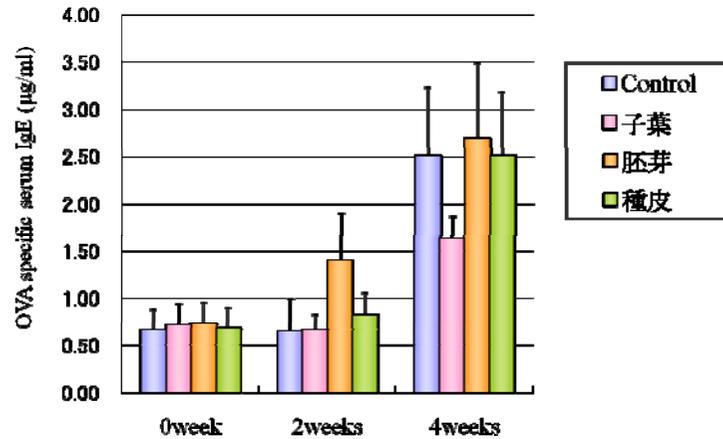
子葉: たんぱく質 主にグリシニンと
 β -コングリシニン

炭水化物 デンプンはわずか
オリゴ糖が主な成分

脂質 不飽和脂肪酸が約80%
リノール酸、オレイン酸、
リノレン酸など

青大豆の胚芽、種皮、子葉の3部位に分けたものを粉碎し
それぞれを熱水抽出(95°C,1hour)し、飼料に混合

試験結果③ 部位別の比較



子葉部に活性を持つものが存在している可能性が示唆される

抗アレルギー効果総括

青大豆に関して抗アレルギー効果を期待しTh2サイトカイン抑制効果を評価したところ、以下の結果を得た。

- Jaukat 細胞でのIFN- γ 亢進効果
- マウス脾臓細胞でのIL-4抑制効果
- OVA感作モデルでのIgE産生抑制活性

青大豆摂取はアレルギー抑制効果が期待される。

活性成分本体、作用メカニズムに関しては不明な点が多く、今後検討予定

青大豆の抗炎症効果

- 抗アレルギー素材として青大豆が着目されたことからその他の機能を探索した。
- また、各種物理化学的加工を青大豆に加え機能性評価を行った。
- その結果青大豆に**光照射**することで抗炎症効果が確認された。



光照射青大豆の抗炎症効果検討

方法: *in vitro* 抗炎症評価法

ヒトT細胞様株Jurkat 5×10^5 /well

↓

TCR代替刺激 PMA+A23187添加

↓

Sample添加 37°C 18時間

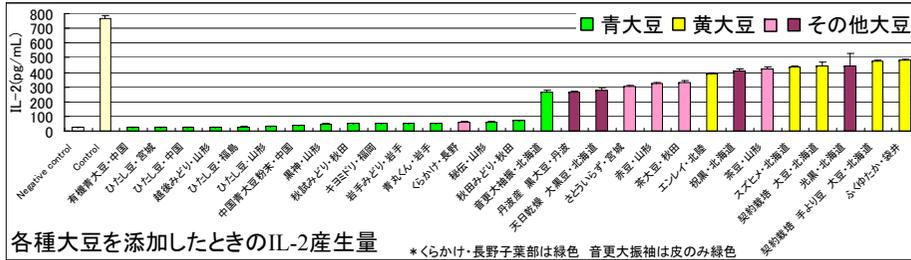
↓

Culture Sup Interleukin-2測定

IL-2測定: ELISA

青大豆品種特異的 IL-2 産生抑制効果

各種大豆品種の活性比較



青大豆EtOH抽出物に青大豆特異的, かつ,
各種銘柄・産地の青大豆に共通なIL-2産生抑制活性

抗炎症機能を有する可能性

疾患モデル動物を用いた *in vivo* 試験による検証へ

物理的加工による活性化の検討

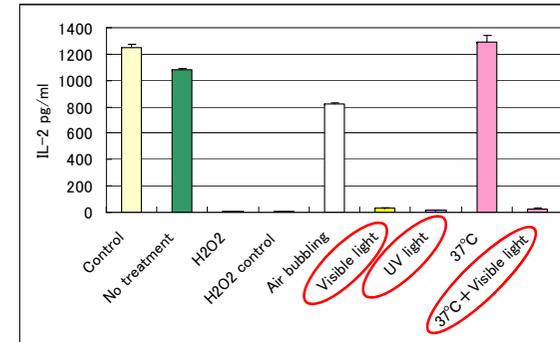
物理的加工

酸化 : H₂O₂ 添加, エアーバブリング 48hr

光照射 : 蛍光灯照射48hr, UV灯照射48hr

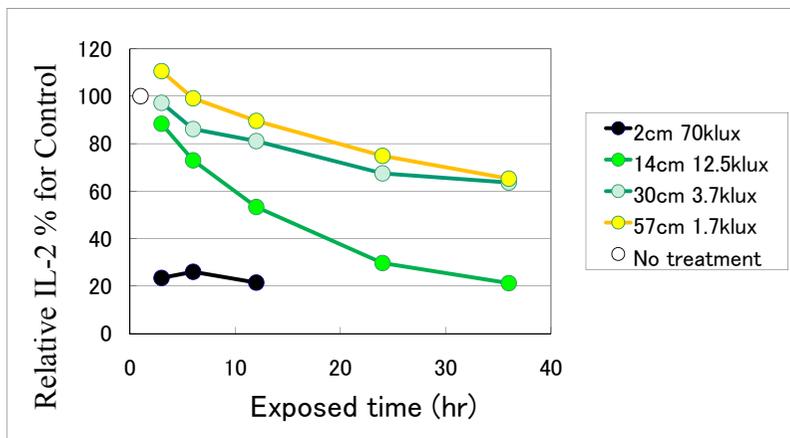
加温 : 37°C 48hr

評価対象: 青大豆EtOH抽出物



蛍光灯またはUV灯照射によって活性化.

EtOH抽出物蛍光灯照射によるIL-2の経時変化



青大豆サンプル調製方法

乾燥種子粉碎(ミキサー)

↓
ヘキサン脱脂

↓
脱脂残渣

↓ (乾燥)

↓
5倍量エタノール添加

↓
2時間攪拌抽出(室温)

↓
吸引濾過

↓
上清

↓
濃縮乾燥
(収率 2%)

エタノール抽出物

乾燥種子粉碎(ミキサー)

↓
5倍量熱水添加

↓
1時間攪拌抽出(97°C)

↓
遠心(13,300 × g, 20分)

↓
吸引濾過

↓
上清

↓
凍結乾燥
(収率 25%)

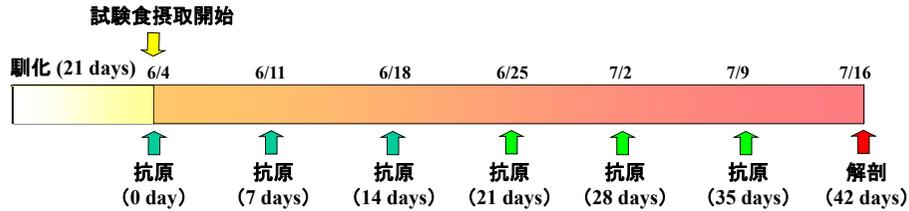
熱水抽出物

方法: *in vivo* アトピー性皮膚炎モデル

動物: NC/Ngaマウス(♂) 8匹/群... アトピー性皮膚炎を発症しやすい
 抗原: コナヒョウヒダニエキス(ピオスタAD)
 耳介, 背中に塗付



- ① 無処理群
- ② コントロール群
- ③ 光照射青大豆エタノール抽出物(5%混餌)摂取群
- ④ 光照射青大豆熱水抽出物(5%混餌)摂取群



測定項目: 体重, アトピー性皮膚炎スコア

結果: 皮膚炎症状比較

コントロール群

青大豆摂取群

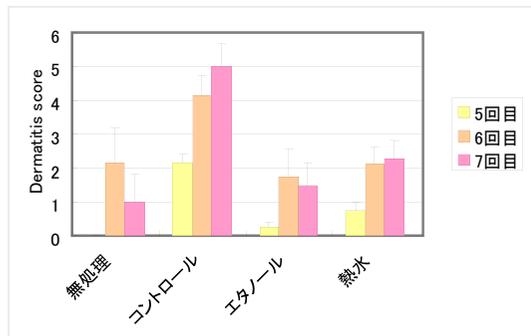


か皮(びらん・潰瘍)の発生

表皮剥離
発赤10箇所以上

無症状

結果: 皮膚炎スコアの比較



皮膚炎スコア
 0: 無症状
 1: 表皮剥離, 発赤4箇所以下
 2: 表皮剥離, 発赤5箇所以上
 3: 表皮剥離, 発赤10箇所以上
 4: 弱いびらんの発生
 5: か皮(びらん・潰瘍)の発生
 6: か皮(びらん・潰瘍)2箇所以上

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. control. Steel's multiple comparison test

青大豆にアトピー性皮膚炎症状を抑制する効果があることを病態モデルにおいて確認できた。

皮膚症状の変化(同一個体での経時変化)

コントロール群

青大豆(エタノール)群

6週目(スコア5)

6週目(スコア5)



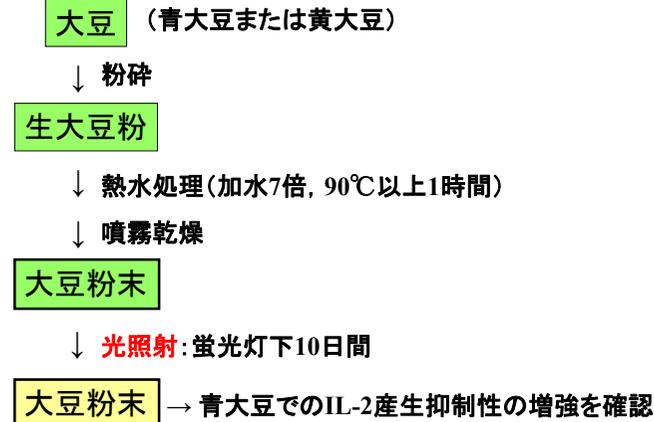
7週目(スコア6: 明確な増悪)

7週目(スコア3: 治癒傾向)



追試験:青大豆のアトピー性皮膚炎抑制効果検証

大豆サンプル調製方法



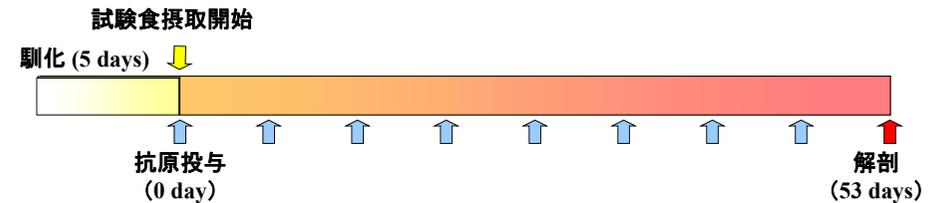
方法:追試験 青大豆のアトピー性皮膚炎抑制効果検証

動物: NC/Ngaマウス (♂) 8または6匹/群

抗原: コナヒョウヒダニエキス (ビオスタAD)

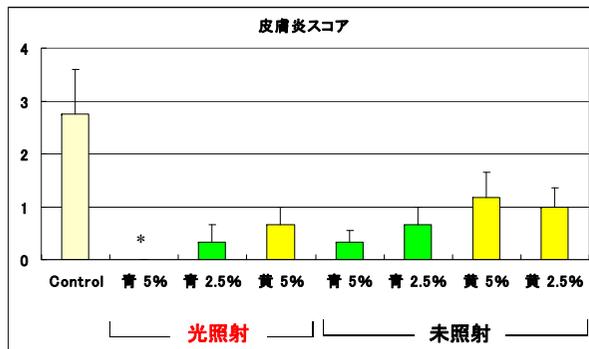
試験群:

- | | |
|-------------------|-----------------|
| 1. コントロール (AIN76) | 5. 光未照射青大豆 5.0% |
| 2. 光照射 青大豆 5.0% | 6. 光未照射青大豆 2.5% |
| 3. 光照射 青大豆 2.5% | 7. 光未照射黄大豆 5.0% |
| 4. 光照射 黄大豆 5.0% | 8. 光未照射黄大豆 2.5% |



測定項目: 体重, 背皮膚肥厚, アトピー性皮膚炎スコア

1. 青大豆のアトピー性皮膚炎抑制効果の検証—追試験



皮膚炎スコア

- 0: 無症状
 1: 表皮剥離, 発赤4箇所以下
 2: 表皮剥離, 発赤5箇所以上
 3: 表皮剥離, 発赤10箇所以上
 4: 弱いびらん・潰瘍の発生
 5: か皮(びらん・潰瘍)の発生
 6: か皮(びらん・潰瘍)2箇所以上

* $p < 0.05$ vs. control by Steel's multiple comparison test.

- ① 青大豆摂取群では皮膚炎が抑制された。→再現性
- ② 青大豆の皮膚炎抑制効果は濃度依存的であった。
- ③ 黄大豆と比べて青大豆の効果大。→青大豆の優位性
- ④ 光照射なしでも効果あり。

【抗炎症効果総括】

in vitro

1. 青大豆エタノール抽出物は, 光照射によりIL-2産生抑制活性が増強する
2. 活性は光照射度、照射時間に比例し増加する
3. この効果は青大豆品種特異的

in vivo

1. アトピー性皮膚炎病態モデルマウスを用い、光照射青大豆に皮膚炎症状抑制効果を確認
2. 再現性を確認
3. 依存性を確認
3. 黄大豆に対する優位性を確認
4. 光照射なしでも *in vivo*では効果を確認

青大豆開発における今後の予定

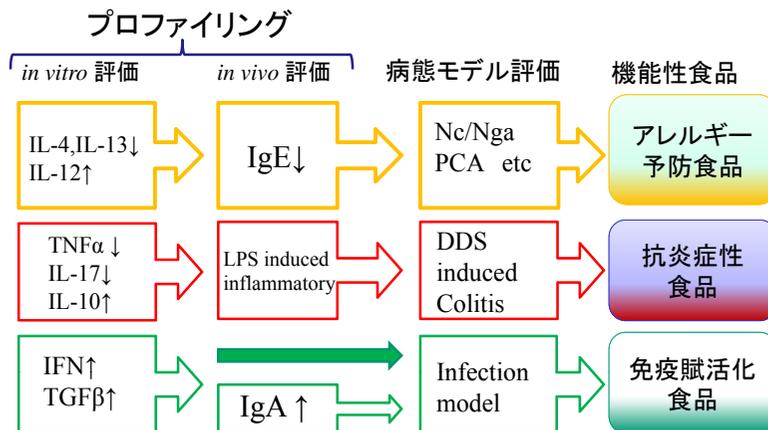
- 青大豆抗炎症効果の有効性成分の単離同定
- 抗炎症効果の作用メカニズム解析
- 他の抗炎症モデルによる評価
- 光照射代替加工方法の模索

静岡県立大寄附講座における機能性食品素材開発への展望

- 免疫機能に影響する食品素材の探索
 - ★ サイトカインプロファイルによる食品素材の機能性追求
 - ★ 的確な *in vivo* による有効性確認
- 光照射など物理的加工による機能性亢進
 - ★ 光照射は新規な加工技術として新規素材の可能性を拡大する事が期待される
- 抽出法による有効性の拡大
 - ★ 亜臨界抽出等マイナー成分の機能性拡大

寄附講座シーズ評価研究概要

厳選候補食品素材を各種免疫細胞を用いてサイトカイン産生を評価し、最適な *in vivo* 評価により免疫学的特徴を明らかに(プロファイリング)。その後、更に有効性を疾患モデルで評価することにより、機能性食品として可能性を検証する。



静岡県立大学日清製粉グループ寄附講座

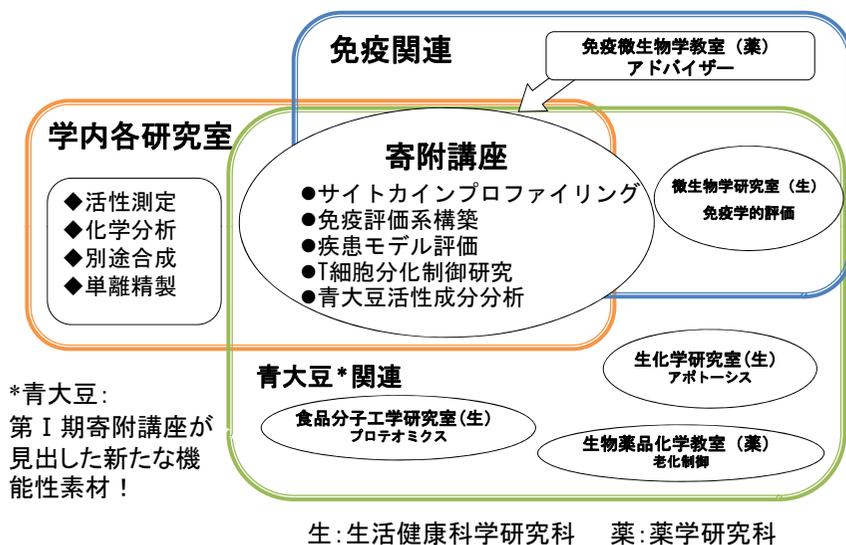
2010年9月で終了した第Ⅰ期寄附講座を引き継ぎ、2010年10月開設。

第Ⅰ期寄附講座では免疫、抗疲労、抗ストレスをキーワードに研究が進められ、アレルギー体質改善に有効な青大豆等の機能性を有する食品を見出した。

第Ⅱ期寄附講座では、これら成果を更に商品化に繋げることを目指して、関連研究を展開予定。

- 開設期間：2010年10月1日～2014年3月31日
- 寄付金及び研究費：総額 1億1200万円
- 期待される研究成果：
 - ① 食品成分による免疫疾患の予防
 - ② 食品成分による免疫担当細胞を介した生活習慣病予防

共同研究体制



寄附講座スタッフ



教授	中山 勉	農学博士
客員准教授	今井 伸二郎	医学博士
ポスドク	彭 徳子	医学博士
客員研究員	安井 謙介	農学修士
研究補助員	田口今日子、亀岡葉子、伊藤知子	理学博士 静岡県立大学名誉教授
アドバイザー	伊勢村 護	

協力研究機関

- 株式会社日清製粉グループ基礎研究所
- 日清ファルマ株式会社健康科学研究所

寄附講座連絡先

静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科
 日清製粉グループ寄附講座高次機能性食品探索研究室
 〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1
 TEL/FAX 054-264-5824
 E-mail imaish@u-shizuoka-ken.ac.jp (連絡先: 今井)
 URL
 静岡県立大学 <http://www.u-shizuoka-ken.ac.jp/>
 寄附講座 <http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/nissin/index.html>