

平成18年度シーズ発掘試験研究報告書

報告日：平成19年3月14日

課題名：パン酵母とそのミルク抗体を原料にした花粉症予防食品開発のための可能性試験

研究期間：平成18年8月18日～平成19年2月28日

1. 担当コーディネータ

氏名(役職)	清水義治(産学官連携推進コーディネータ, 客員教授)	印
所属機関名	国立大学法人信州大学産学官連携推進本部伊那地区	
連絡先	所在地	〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304
	TEL/FAX	0265-77-1647/0265-77-1315
	E-mail	lkuko_fukuzawa@su-oasis.jm.shinshu-u.ac.jp (レジストラー福澤郁子)

2. 代表研究者(代表研究者のみ記入してください。)

氏名(役職)	大谷 元(大学院農学研究科教授)	印
所属機関名	信州大学	
連絡先	所在地	〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304
	TEL/FAX	0265-77-1430/0265-77-1700
	E-mail	otani84@gipmc.shinshu-u.ac.jp

3. 共同研究者(受託研究契約を締結した共同研究機関の場合のみ記入してください。)

氏名(役職)		印
所属機関名		
連絡先	所在地	
	TEL/FAX	
	E-mail	

5. 試験研究の結果報告

(1) 試験内容

①研究の当初の目的と試験項目

本シーズ発掘試験への応募前に、筆者はマウスにウシ初乳 IgG を経口投与すると免疫グロブリン産生が著しく低下するとともに、マウスを用いたインビトロの実験において、乳汁 IgG 抗体と抗原との複合物が抗原提示細胞に接すると FcγIIb レセプターを介して抗原提示細胞に結合することにより免疫グロブリンの産生が抑制されることを見出していた。そこで、本申請研究は以下の2つの試験を行うことを目的とした。

- (1) 妊娠中のシバヤギにパン酵母を免疫し、分娩後の乳汁にパン酵母に対する IgG 抗体を産生させ、その IgG 分画を調製すること
- (2) パン酵母とパン酵母に対するシバヤギ乳 IgG 抗体を含む飼料でアレルギー自然発症マウスを飼育することにより、それら無添加の飼料で飼育した場合よりもマウスのアレルギー症状の発症が軽減されるか否かを明らかにすること

②試験期間において実施した内容

上述した2つの試験のうち、(1)に関しては完全に実施できた。しかし、(2)に関しては、ヤギの妊娠期間が5ヶ月、さらに乳汁を得るのに2ヶ月かかり、本課題の採択と同時に実験を開始したがパン酵母に対するヤギ乳 IgG 抗体が調製できた段階で試験終了期限の2月を迎えた。そのために、アレルギー自然発症マウスでのアレルギー軽減作用の有無の試験を行うための準備が整った段階である。

そこで、本報告書には、(2)の結果の代わりとして、本申請研究では計画していなかったが、関連研究として別途行っていた、(3) 大腸菌とそれに対する牛乳 IgG の複合物を含む飼料でマウスを35日間飼育し、腸管パイエル板細胞のトランスクリプトームを無添加飼料で飼育したマウスのそれと比較することにより、乳汁 IgG と抗原との複合物が花粉症軽減作用を有する可能性があるかどうかを検討した結果について記述する。

(2) 得られた成果

(1) パン酵母に特異的なシバヤギ乳 IgG 抗体の調製について

妊娠を確認した分娩経験のあるシバヤギと分娩経験のないシバヤギ各2頭に、分娩約2ヶ月前から1週間間隔で、Freundの完全アジュバントでエマルジョンにしたパン酵母を10回免疫した。分娩経験のあるシバヤギは2頭ともに無事分娩したが、分娩経験のないシバヤギは2頭とも流産した。2頭のシバヤギの分娩日から62日~70日までの間、毎日乳汁を集めた。また、免疫開始前日から定期的に採血を行った。経時的に集めた血液と乳汁中の総 IgG 量と酵母菌特異 IgG レベルをそれぞれ放射性免疫拡散法と酵素免疫測定法で測定した。また、それらの乳汁から調製したホエイに硫酸アンモニウムを加えて40%飽和にし、沈殿物を回収し、脱塩後凍結乾燥を行うことにより、パン酵母に特異的な IgG を豊富に含む分画を3.64 g 得た(2頭のシバヤギの合計)。なお、2頭のシバヤギの乳汁中の総 IgG 量の変動パターンと、分娩1ヵ月後の乳汁中のパン酵母特異活性を1とした場合の特異抗体の変動パターンをそれぞれ図1および図2に示した。もちろん、これらの結果だけでは学会発表や特許申請を行うことはできず、予定していた(2)の結果が出た段階で学会発表や特許申請を考えている。

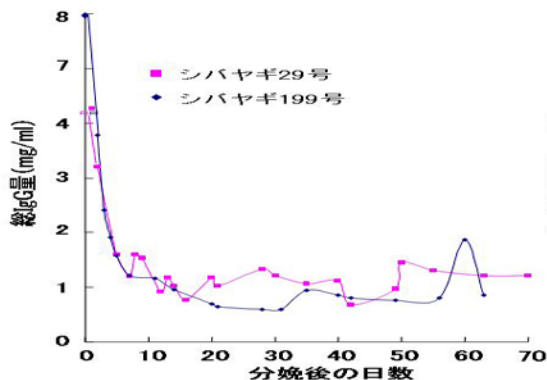


図1. パン酵母免疫シバヤギ乳汁中の総 IgG 抗体量の変動

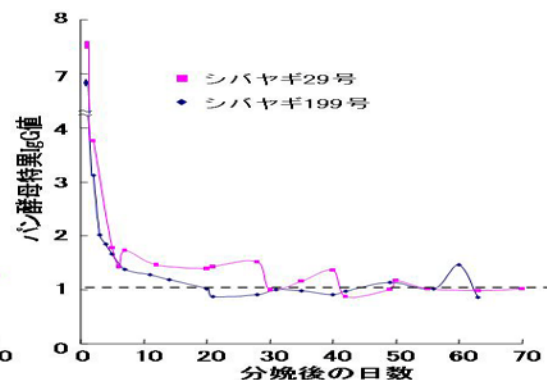


図2. パン酵母免疫シバヤギ乳汁中のパン酵母特異 IgG レベルの変動 (分娩30日後の ELISA 値を基準値1とした)

(2) 調製したパン酵母抗体を用いたマウスへの経口投与試験は上述したとおり、これから始めるところである。なお、本計画が実行できなかった原因はシバヤギの妊娠期間が5ヶ月、さらに乳汁を得るのに2ヶ月を要したことによる。

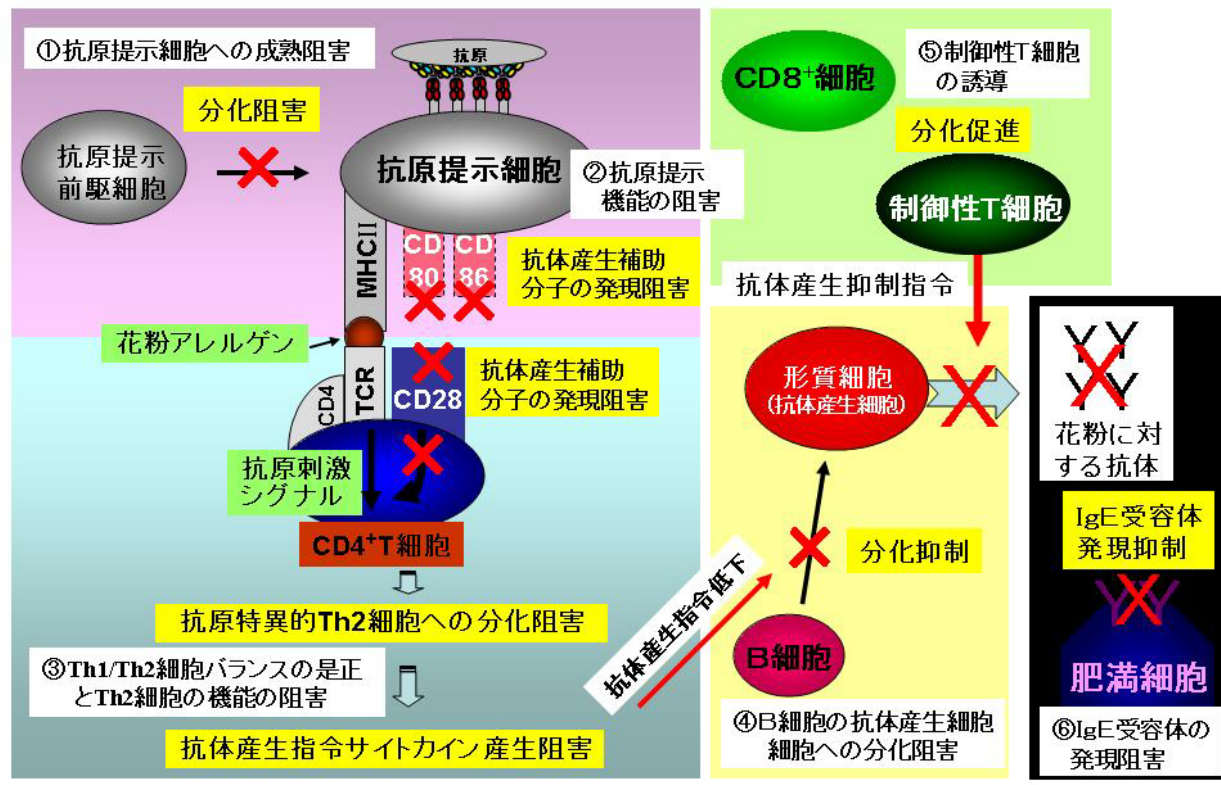
(3) 大腸菌とその牛乳 IgG 複合物添加飼料で飼育したマウスパイエル板細胞のトランスクリプトーム解析

大腸菌と牛乳 IgG 複合物を 0.1% 量含む飼料で C3H/HeN 系マウスを 35 日間飼育し、パイエル板細胞の免疫関連成分に対する mRNA の発現レベルをそれら複合物無添加飼料で飼育した場合と比較した。下表に示すとおり花粉症の発症や抗腫瘍活性と関係する成分の mRNA の発現に変動が見られた。

機能・分子名	相対的発現レベル (log ₂ -大腸菌複合物/コントロール)			
	0	1	2	3
成熟樹状細胞マーカー・Decysin	0.270			
抗原提示補助分子・CD80	0.524			
T細胞受容体補助因子・CD28	0.759			
Th1細胞分化マーカー・IL-18受容体			1.471	
Th2細胞分化マーカー・IL-4	0.841			
Th3細胞分化マーカー・TGF-β1			2.093	
Th2サイトカイン・IL-10	0.580			
未熟B細胞マーカー・CD10			2.599	
制御性T細胞マーカー・CD122			2.030	
IgE受容体・αγ7 ユニット	0.457			
βγ7 ユニット	0.613			
γγ7 ユニット	0.336			
Fc receptor-like 3	0.451			
がん抑制たんぱく質・ATM				3.021
BRCA1				2.142
p53				2.104

上表に基づき、大腸菌と牛乳 IgG 複合物が液性免疫応答に及ぼす作用を図式化すると以下のようになり、**図中の①～⑤**の作用により、牛乳 IgG と抗原との複合物の経口摂取は花粉症を軽減することが示唆される。このことは、パン酵母とその乳汁 IgG 複合物を調製し、カプセル化などにより腸管まで変性を受けずに到達するにすれば、花粉症が軽減される可能性を示唆している。なお、この結果は 2007 年 3 月 27 日～29 日に麻布大学で開催される第 107 回日本畜産学会大会で報告する。

牛乳IgG・大腸菌複合物添加飼料で飼育したネズミパイエル板細胞の mRNA 解析に基づく牛乳IgGの抗体産生抑制作用部位



(3) 今後の展開

今後も本申請課題に関係した研究を勢力的に行う所存である。具体的には以下のことを計画している。

- ①まず、本申請研究により、パン酵母特異 IgG 抗体を豊富に含むシバヤギ乳 IgG 分画の凍結乾燥粉末を 3.64 g 調製できた。そこで、本申請研究で試験項目としてあげていたが時間的制約から実施できなかった、「アレルギー自然発症マウスへの経口投与試験によるアレルギー症状軽減作用の有無」を検討する。また、その結果と平成 18 年度の結果を合わせて学会発表、論文投稿、特許の申請等を考える。
- ②本申請研究を発展させるために、平成 19 年度～21 年度の文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C)を申請している。
- ③信州大学内に設置されている(株)信州 TLO を管理事務局として、民間企業との共同で、ウシにパン酵母を注射してパン酵母特異牛乳 IgG 抗体を調製し、パン酵母と牛乳 IgG 複合物がヒトにおいて花粉症軽減効果を示すかどうかの確認を目的とした研究を行うための資金の獲得に向けた申請(NEDO)を行うことを検討している。この計画は実用化を前提としたものである。

(4) 知的財産権について

既に述べたように時間的制約から、平成 18 年度だけでは本申請研究で計画した試験を全うするには至らなかった。しかし、本申請研究は筆者が最近、勢力的に取り組んでいる課題であり、平成 18 年度には貴法人から頂戴した研究費以外の研究費によっても関連研究を行った。その内容は上述した、(1)試験内容の②試験期間において実施した内容、(3)である。この成果によって次の 2 件の特許申請を行ったことを付記しておく。

- 1) 免疫グロブリン Fc フラグメントレセプター及び/又は免疫グロブリン Fc フラグメントレセプター様タンパク産生抑制剤及びその使用、特願 2007-14953、平成 19 年 1 月 25 日出願、出願人：国立大学法人信州大学、兼松ウエルネス(株)、発明者：大谷 元、畑 勲
大腸菌と牛乳 IgG の複合物をマウスに経口投与すると、抗原提示細胞、Th2 型細胞および B 細胞の分化が抑制され、その結果、免疫グロブリンの産生が抑制される。また、制御性 T 細胞が誘導されたり、IgE レセプターの発現が抑制される。これらの結果から、乳汁 IgG 抗原複合物を材料にして抗アレルギー機能を有する食品が開発できる。
- 2) 免疫グロブリン G を含有する経口用免疫調節剤、その製造方法及び経口用免疫調節剤を配合している飲食品、特願 2007-14966、平成 19 年 1 月 25 日出願、出願人：国立大学法人信州大学、兼松ウエルネス(株)、発明者：大谷 元、畑 勲
牛乳 IgG の Fc フラグメントをマウスに経口投与すると IgE レセプターの発現が抑制される。このことから、牛乳 IgG の Fc 領域を原料にしたアレルギー軽減食品が開発できる。

(5) 今後のフォローアップ等について (コーディネータ記載)

※記載のポイント

本試験終了後、得られた研究成果を活用し、研究者と連携しながら行う、シーズの実用化に向けたフォローアップの活動予定について記入してください。

この頁は後ほど、コーディネータがメール添付ファイルでお送りします。お手数をおかけしますが、この頁のみ今回お送りしたものを削除し、後ほどお送りするものを使用してください。また、恐れ入りますが、3部郵送しましたものにも取替えをお願いします。

