清酒醸造工程産物による IL-12 p 40 の産生

天野義文¹・丸木裕介¹・中村和夫¹・
 伊藤正彦¹・河村正輝¹・葛西宏威¹・
 大澤慶暢²・菊池良充²・渡辺正平³
 (¹山梨大学大学院医学工学総合研究部・
²太冠酒造株式会社・³山梨県酒造組合)

平成 20 年 1 月 17 日受理

IL-12 p 40 Production Induced by Products
 from a Japanese Sake Manufacturing Process

Yoshifumi AMANO¹, Yusuke MARUKI¹,
 Kazuo NAKAMURA¹, Masahiko ITO¹,
 Masaki KAWAMURA¹, Hirotake KASAI¹,
 Yoshinobu OSAWA², Yoshimitsu KIKUCHI²,
 Masahira WATANABE³

(¹Interdisciplinary Graduate School of Medicine and
 Engineering, University of Yamanashi, Takeda,
 Kofu, Yamanashi 400-8511, Japan)

²Taikan Sake Co. Ltd., Kamimiyaji, Minamiarupusu,
 Yamanashi, 400-0312, Japan)

³Yamanashiken Shuzokumiai, Kokubo, Kofu,
 Yamanashi, 400-0043, Japan)

IL-12 is known to be one of the cytokines that causes an immunity balance shift to the Th 1 side. It was examined whether products from a Japanese sake-brewing process influence the production of IL-12 p 40. When the extracts of the products were added to the assay system, the production of IL-12 p 40 by the mouse macrophages (J 774.1) was promoted. The production of IL-12 p 40 was stimulated not only by the addition of the alkaline extract from the *moromi* mash in the sake-brewing process but also the extracts from Japanese sake and sake cake.

Key words : IL-12 p 40, 清酒, 食品機能

緒言

植物ならびに微生物由来の高分子糖質は免疫応答を引き起こすことが知られている¹⁾。米糠のアラビノキシラン²⁾、酵母やカビの細胞壁成分(β -グルカン、マン

ナン)^{3,4,5)} やそれらの変性化合物は動物細胞では非自己として認識される。清酒醸造は米、麴および酵母が関与して行われることを考慮すれば何らかの免疫応答を生ずる可能性がある。本研究では清酒醸造工程から得られる各種試料が免疫賦活活性の発現に及ぼす影響を調べた。

免疫応答に関与するヘルパー T 細胞 (Th) のサブセットの種類と相互関係についてこれまでに多くの知見が得られている^{6,7)}。T 細胞の免疫応答のメカニズムについて、近年明らかにされつつあるサブセットのヘルパー T 17 細胞 (Th 17) が関わる影響を現時点で明快に述べることは出来ない。しかし、ヘルパー T 細胞の 1 型細胞 (Th 1) と 2 型細胞 (Th 2) のバランス (Th 1/Th 2) は依然として免疫系において重要な役割を担っていると考えられる^{8,9,10)}。これまでの研究結果より、Th 2 優位ではアレルギーを惹起するサイトカインの分泌が盛んになり、Th 1 優位のときにはインターフェロン γ (INF- γ) 等のサイトカイン産生が認められている。ナイーブ T 細胞から Th 1 細胞への分化誘導にはインターロイキン 12 (IL-12) が関与する¹¹⁾。IL-12 は IL-12 p 35 と IL-12 p 40 の 2 つのサブユニットで構成されるが、ヘテロダイマーが Th 1 誘導に有効である。IL-12 p 40 は β -グルカンやリポ多糖 (LPS) で誘導産生され、恒常的に発現している IL-12 p 35 とヘテロダイマーになる¹²⁾。最近、住環境や食生活の影響により Th 1/Th 2 バランスの均衡が崩れ、体質が Th 2 側に偏向していると言われている¹³⁾。日常摂取できる食品を通じて、この偏向したバランスを回復維持出来る方法が望まれる。清酒及び関連飲料の適正な摂取が健康維持に有効であることは古くから経験的に知られている^{14,15)}。その因果関係全体のメカニズムを適格に証拠づける事は出来ないが、清酒に含まれる成分による生理学的効果と共に、自律神経系への影響による複合的作用が良い効果をもたらしていると考えられる。本研究ではこれまでに明らかにされている清酒成分の生理学的効果に加えて、免疫賦活効果の有無を試験した。即ち、清酒製造工程産物の抽出液をマクロファージに感作させ IL-12 p 40 の産生活性を求めた。

実験方法

1. 試料ならびに調製方法

実験には平成 17 年に収穫された山梨県産美山錦(玄

Fig. 1 Sample preparation procedure

米ならびに精米歩合 50 %), 富山県産五百万石 (精米歩合 50 %) および山形県産はなの舞い (精米歩合 65 %) を使用した。酒母麴 (種麴) にはヒカミもやし醗立て用を使用した。掛け (添え, 仲, 留め) 麴はヒグチもやし醗用を使用した。温度経過は 3 種類で若干の違いはあったがおおよそ, 添え 12°C, 踊り 15°C, 仲 11°C および留め 9°C で, 主発酵時の最高温度は留め後 5 日目で 13°C になった。醗日数は 20 日で醗酵終了時の温度は 8°C であった。

これらの原料米, 麴ならびに主醗酵醗から試料を採取した。各試料は Fig. 1 に示した方法により抽出操作を行い, オートクレーブを使用した熱水抽出物とアルカリ溶液抽出物の凍結乾燥試料を調製した。凍結乾燥試料 (50 mg) を精製水に溶解後, Fig. 2 に示した手順により ELISA 測定用試料を調製した。

2. IL-12 p 40 産生活性測定法

IL-12 p 40 産生量の測定には BALB/c マウスに由来する Th 2 型のマクロファージ J 774.1 を使用した。IL-12 p 40 の産生量は ELISA 法 (BD Biosciences,

OptEIA™, Mouse IL-12 (p 40) ELISA Set) によりプロトコルに従って測定した。産生活性は各ウェル中に産生された IL-12 p 40 の濃度 (pg/ml) で定義した。各試料について 3 回測定した。本測定方法による検出限界は 10 pg/ml であった¹⁶⁾。

3. LPS 中和試験

LPS はグラム陰性菌の外膜構成成分で IL-12 p 40 を始め広範な免疫活性化能を示す。活性測定系内に LPS が混入していると測定値が高くなる。清酒醸造成分に基づく正味の IL-12 p 40 産生能を評価するために LPS をポリミキシン B で中和する実験を行った¹⁷⁾。ポリミキシン B は LPS の活性中心であるリピド A に結合して活性を中和する。ポリミキシン B を反応系内濃度 20 µg/ml となるよう調整して IL-12 p 40 産生活性を求めた。

Fig. 2 Preparation method for ELISA sample

Table 1 Effect of rice and rice-koji on IL-12 p 40 production

Raw material rice	Brand name	Miyamanishiki		Gohyakumangoku		Hananomai	
	Polished ratio(%) (Residual ratio)	brown rice(not polished)		50		65	
Extraction solvent		Hot-water	Cold-alkaline	Hot-water	Cold-alkaline	Hot-water	Cold-alkaline
Rice		0.0	182.6±19.5	0.0	41.6± 7.3	86.9±11.5	0.0
Rice-koji		nd	nd	0.0	115.5±11.5	142.5±16.4	67.0±0.0

IL-12 p 40 produced (pg/ml)

nd : not determined

実験結果

1. 原料米ならびに麴による IL-12 p 40 の産生活性

原料米の試験には美山錦(玄米)、五百万石およびはなの舞いを使用した。美山錦(玄米)のアルカリ抽出区分で IL-12 p 40 の産生量が高かった (Table 1)。美山錦(玄米)と五百万石では熱水抽出区分には産生活性が認められずアルカリ抽出区分で活性があった。一方、はなの舞いではアルカリ抽出区分には活性が無く熱水抽出区分で産生活性があった。

麴試料を用いた試験において、はなの舞いでは熱水抽出、アルカリ抽出の双方で活性があったが五百万石ではアルカリ抽出試料にのみ活性が認められた。

2. 醗酵醪による IL-12 p 40 の産生活性

原料米として美山錦(精米歩合 50 %), 五百万石およびはなの舞いを使用し醸造を行った。留め添え後, 13°C以下に保って醗酵を継続させ, その醗酵醪から経過日数を追って試料を採取した。Fig. 1 に示した方法により得られた抽出物の平均収量(乾燥重量基準)は醗酵醪で熱水抽出物 10.8~19.7(%), アルカリ抽出物 5.0~10.5 (%), 粕ではそれぞれ 14.8~17.5 (%),

Table 2 Effect of raw material rice and fermentation time on IL-12 p 40 production

Raw material rice	Brand name	Miyamanishiki		Gohyakumangoku		Hananomai	
	Polished ratio(%) (Residual ratio)	50		50		65	
Extraction solvent		Hot-water	Cold-alkaline	Hot-water	Cold-alkaline	Hot-water	Cold-alkaline
Fermentation time	6 days	0.0	101.4±10.3	0.0	3,799±199.3	0.0	211.8± 2.1
	13	0.0	104.7± 4.4	0.0	160.0± 3.6	0.0	281.7±60.0
	20	0.0	30.0± 0.9	0.0	804.4± 28.7	31.2±7.8	38.7± 1.0
Sake		0.0	76.7± 0.0	0.0	167.1± 96.8	0.0	0.0
Sake-cake(<i>sake-kasu</i>)		0.0	500.5±10.5	0.0	0.0	0.0	0.0

IL-12 p 40 produced (pg/ml)

Fig. 3 Influence of polymyxin B on IL-12 p 40-inducing activity of raw material rice, fermented-moromi, and sake-cake. Alkaline extract samples were used for the analysis. Results are expressed as means±SEM, n=3.

7.5~12.0 (%)であった。各試料による産生活性を測定した結果を Table 2 に示した。美山錦(精米歩合 50 %),五百万石およびはなの舞いの三品種すべてについて,6,13,20 日目に採取した醪試料のアルカリ抽出物で IL-12 p 40 の産生活性が認められた。全体として醱酵前期の醪試料で高い産生活性が得られ,醱酵後期には低下する傾向があった。熱水抽出物に関しては,はなの舞いの 20 日目の醪で産生活性 (31.2 pg/ml) が得られた他は活性がなかった。

3. 生成酒と酒粕による IL-12 p 40 の産生活性

上槽分離後の生成酒では美山錦(精米歩合 50 %)と五百万石のアルカリ抽出試料で IL-12 p 40 産生活性

が認められた (Table 2)。しかし,はなの舞いのアルカリ抽出物では活性がなかった。熱水抽出物では 3 種の試料とも活性がなかった。また,酒粕については美山錦のアルカリ抽出試料にのみ活性が認められた。

4. ポリミキシン B による中和試験

産生活性が見られた試料画分の一部について, LPS の影響を検討する目的でポリミキシン B による中和試験を行った。その結果,原料米で産生活性の高かった美山錦(玄米)のアルカリ抽出試料では,中和により産生活性は 182.6 pg/ml から 50.8 pg/ml に低下した (Fig. 3)。一方,五百万石の醪 6 日目の試料では中和により IL-12 p 40 産生量は 3,799.2 pg/ml から

3,308.2 pg/ml へと変化したが、なお高い残存活性があった。また、その他の試料（はなの舞いの醪、美山錦（精米歩合 50 %）の酒粕）についても中和による若干の活性低下が認められた。

考 察

原料米を試料とした時の IL-12 p 40 産生活性において、美山錦（玄米）と五百万石のアルカリ抽出区分で活性が認められ、美山錦で特に活性が高かった。この試料での LPS の影響を見るため、ポリミキシン B による中和実験を行ったところ産生量は中和をしない場合と比較し 27.8 % まで低下した。すなわち玄米では LPS の影響が大きいと考えられる。一方、はなの舞いでは熱水抽出区分で活性が見られ、この結果は他の 2 つの原料米の結果と異なっていた。

醱酵中の醪では醱酵前期で産生活性が高く、醱酵後期にかけて産生活性は低下していく傾向にあった。活性の高かった三試料について中和実験を行ったところ、LPS の影響の大きさは試料により異なっていたが、醱酵醪では中和後も残存活性（残存率：51.9～87.1%）が認められた。以上の結果、醸造工程の中で醱酵前期の醪は IL-12 p 40 の高い産生活性を発現させることが明らかとなった。醪を含む酒類には生活習慣病を予防する効果があるとの報告もあることから、さらなる検討が必要である¹⁸⁾。また、焼酎粕を使用した *in vivo* 試験で IL-12 の産生が促進されることが報告されているが¹⁹⁾、清酒醸造においても上槽分離後の生成酒ならびに酒粕のアルカリ抽出物は IL-12 p 40 の産生を促すことが本研究により明らかとなった。

今回測定した試料ではアルカリ抽出区分で高い活性が見られた。食物を分解吸収する消化器官においては食物の消化物がアルカリ側に傾く消化器官部位もある。消化物が腸管で吸収され免疫バランスに何らかの効果をもたらす可能性も期待できる。

本研究では、清酒醸造工程の各時期における試料からの抽出物が IL-12 p 40 の産生活性の発現に有効であることを明らかにした。しかしながら、原料米の種類や精米歩合、熱水抽出試料とアルカリ抽出試料の違い、ならびに醸造工程の各段階と産生活性との明確な関係を明らかにするまでには至らなかった。今後、各画分に含まれる成分を分析し、産生活性との相互関係を明らかにすることが必要である。

なお、ここで得られた結果はマウスマクロファージを使用して得られた実験結果であり、ヒトに対する効果を述べているものではない。

要 約

免疫バランスを Th 1 側へシフトさせる指標の一つである IL-12 p 40 の産生が清酒醸造工程から得られる試料で発現されるか否かについて検討した。その結果、IL-12 p 40 の産生活性が促進されることを確認することが出来た。醱酵期の醪をアルカリ抽出した試料のみならず、上槽後の生成酒や酒粕の抽出物でも IL-12 p 40 の産生活性が認められた。

本研究では IL-12 p 40 の産生活性の有無の確認を主目的とした。そのため、原料米の種類、精米歩合ならびに麹、酵母の影響、醱酵経過との関係を十分明らかにするまでには至らなかった。

文 献

- 1) 山崎正利：食と免疫 研究の最前線-食シグナル・生体統御系間相互作用（明治乳業）寄附講座記念シンポジウム-講演要旨集，p. 10（2003）
- 2) M. Ghoneum and M. Matsuura： *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **17**, 283-292（2004）
- 3) L. Jung-Nam, L. Do-Youn, J. In-Hye, K. Gi-Eun, K. Hye Nam, S. Jeongwon, K. Sangduk and K. Chan-Wha： *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 837-841（2001）
- 4) A. C. Pelizon, R. Kaneko, A. M. V. C. Soares, D. A. Meira and A. Sartori： *Physiol. Res.*, **54**, 557-564（2005）
- 5) 三枝静江，細井知弘： *醸協*, **100**, 530-537（2005）
- 6) Z. Yao, W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen and M. K. Spriggs： *Immunity*, **3**, 811-821（1995）
- 7) C. T. Weaver, R. D. Hatton, P. R. Mangan and L. E. Harrington： *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 821-852（2007）
- 8) 細井知弘： *醸協*, **98**, 830-839（2003）
- 9) 八村敏志： *化学と生物*, **43**, 509-515（2005）
- 10) 永渕真也： *化学と生物*, **45**, 523-524（2007）
- 11) 小安重夫編： *免疫学最新イラストレイテッド*，羊土社（東京），p 147（2004）
- 12) M. Bette, S.-C. Jin, T. Germann, M. K. H.

- Schafer, E. Weihe, E. Rude and B. Fleischer :
Eur. J. Immunol., **24**, 2534-2440 (1994)
- 13) 古林万木夫：生命工学, **86**, 65-72 (2008)
- 14) 高橋康次郎：醸協, **85**, 286-291 (1990)
- 15) 川戸章嗣：醸協, **100**, 148-157 (2005)
- 16) M. Kawamura, H. Kasai, L. He, X. Deng, A. Yamashita, H. Terunuma, I. Horiuchi, F. Tanabe and M. Ito : Immunol., **114**, 397-409 (2005)
- 17) 菊池充, 渡辺正敏, 小川将, 中村隆二, 斉藤和好, 稲田捷也, 吉田昌男：日消外会誌, **27**, 753-758 (1994)
- 18) 大浦新, 鈴木佐知子, 秦洋二, 川戸章嗣, 安部康久：醸協, **102**, 781-788 (2007)
- 19) 森村茂, 関孝弘, 重松亨, 木田健次：醸協, **100**, 607-617 (2005)
-