

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

オリーブの糖脂質の免疫活性の測定法

作成者：産業技術総合研究所 健康工学研究センター
生体機能評価チーム長 仲山 賢一

1. 糖脂質について

1. 1 概要

糖脂質はほぼ全ての生物がもっている複合分子であり、その構造は親水性の糖鎖と脂溶性の脂質部分からなっている。このため、糖脂質は水にも油にも溶けるとい性質を有している。生物に含まれているときには、主に細胞膜や原核生物では細胞壁に存在しており、様々な生理活性を担っている分子として知られている。特に真核生物に含まれる糖脂質は、セラミドを脂質成分とするものが広く知られており、人間においては、肌の保湿・バリア成分として主に知られておる他、神経系などに多く存在し、神経におけるシグナルの制御や、細胞の増殖制御に大きく関わっていることが明らかとなっている。その制御機構は糖鎖やセラミドにより様々であり、特に糖鎖の違いは顕著にその機能を買えることが知られてきている。また、ほ乳類においてはその糖鎖構造の多様性が知られており、様々な活性を持つと考えられている。

一般的に糖脂質は細胞膜に埋め込まれた状態で存在していることから、一部の食品以外では容易に吸収されない。従って、食品からの糖脂質の摂取はあまり期待できないのが一般的である。近年、食品残渣などから糖脂質成分の抽出を行い、これを添加物として使用することが盛んとなってきている。また、牛乳などの一部の食品は、糖脂質が多く含まれていることも知られている。さらに、多くの糖脂質が免疫系の活性の制御に関わることも知られてきていることから、個々の食品の糖脂質についてその免疫活性を測定することは、食品の付加価値を上げるためには重要であると考えられる。特に免疫系は腸管免疫を通して経口接種からの直接的な作用が見込まれることから重要である。

1. 2 オリーブに含まれる糖脂質の機能性

糖脂質、特に真核生物に含まれるセラミドを脂質部分に持つスフィンゴ糖脂質は、概要にも書いたように肌に含まれるセラミド成分の供給源として、肌の保湿やバリア機能の強化を行うだけでなく、神経の調節や免疫活性の調節などが知られている。そ

の多くの機能は、細胞膜に取り込まれることにより機能するため、有効にその機能を発揮させるためには、食品中の細胞より一度抽出することが重要となる。

オリーブに含まれる糖脂質は「オリーブの糖脂質群」および「オリーブの糖脂質の糖鎖構造決定法」の項で述べたように、主にグルコシルセラミドであり、糖脂質としては非常に単純な構造をしていることが明らかとなっている。グルコシルセラミドは様々なものが知られているが、ここでは主に免疫系に対する機能についての測定法について述べる。

1. 2. 1 糖脂質を含む食品

糖脂質は全ての生物がもっていることから、食品には全て含まれていると考えてよい。ただし、生物種によりその構造は様々であり、ここでは真核生物に含まれるセラミドを含む糖脂質について述べる。ただし、原核性物の糖脂質成分にも機能性があり、一部に他活性を有していることから、同様な活性測定法が応用できる場合が考えられる。これらの糖脂質は細胞膜の構成成分として膜に組み込まれた形で存在しているため、一般的に食品から直接糖脂質を取り込むことはやや困難であると考えられる。ただし、牛乳などの乳製品には液体中に糖脂質が存在していることが知られており、容易に摂取が可能と考えられる。

オリーブの糖脂質は、オリーブオイルに含まれている可能性も考えられるが、ほとんどがオイルの搾滓に残っていることから、食品として含まれる場合はオリーブ果実そのものであると考えられる。

2. オリーブの糖脂質類についての説明

糖脂質の基本的な構造は図1のようなものである。Rの部分は糖鎖が結合しており、生物種や部位により多様な構造が存在していることが知られている。また、植物などの糖脂質はセラミド部分も多様な構造が存在していることが知られている。オリーブの糖脂質はRの部分にグルコースが結合したグルコシルセラミドである。

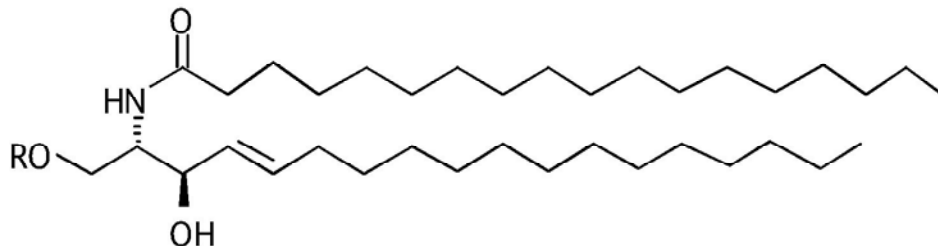


図1 糖脂質の構造

3. 免疫系機能評価の方法について

免疫系機能評価は免疫系の培養細胞を用いた評価法と実験動物を用いた評価法の2つがある。培養細胞を用いる方法は簡便であり評価しやすいが、単一の免疫担当細胞のみを使用しているため生体内の免疫反応を反映しているかどうかは分からない。一方、実験動物を用いた評価法は生体内の免疫反応を反映した結果を得ることが出来るが、個体差が大きく、誤差が大きくなることがある。このため、実験動物を用いた評価法では、実験動物の個体数を増やす必要がある。それぞれ長所と欠点があるこれら2つの評価方法について述べる。また、検出対象をサイトカインの mRNA とする手法についても述べる。

3. 1 準備する器具など

1. 96 穴プレート
2. クリーンベンチ
3. CO2 インキュベータ
4. マイクロタイタープレートリーダー
5. 遺伝子増殖計測システム(リアルタイム PCR)

[試薬]

1. DMEM
2. ウシ胎児血清
3. LPS
4. マウス(BALB-c, ♂, 6 週齢)
5. サイトカイン検出用 ELISA キット (TNF- α 、IL-12、INF- γ 、IL-10、IL-4)
6. TaKaRa RNAiso
7. クロロホルム
8. イソプロパノール
9. 75%エタノール
10. SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR キット
11. ユニバーサルプロープライブラリー

3. 2 培養細胞を利用した免疫系評価法

1. マクロファージ様培養細胞(RAW264) を一つの well あたり 1×10^5 /200 μ l ずつ 96 well plate (平底) に必要 well 数用意する。評価する糖脂質 1 つあたり 3well 用意する。
2. 2 時間以上 37 $^{\circ}$ C にてインキュベートする。
3. 各 well の培地を捨てて、100 μ l ずつ新しい培地を入れる。
4. 残り 100 μ l 中に LPS(100ng/well) とオリーブの糖脂質を必要濃度に調整して各 well に加える。最終的に well あたり 200 μ l となるので、そのことを注意して調整する。

5. 24 時間培養後培養液 100 μ l を回収し、-20 $^{\circ}$ Cにて保存。
6. 培地上清は各種サイトカインアッセイに用いる。

3. 3 実験動物による免疫系評価方法

1. マウス(BALB-c, ♂, 6 週齢, 1 サンプルにつき 3~5 匹)に対し LPS (5 μ g~12 μ g) およびオリーブ糖脂質(0.5~1mg)を腹腔に注射する。
2. 投与後、1、3、6、12、24 時間に眼窩採血により血液を採取(150 μ L ずつ)。
3. 血清は各種のサイトカインの ELISA キットによりサイトカイン量を定量する。

3. 4 mRNA 測定による免疫系評価方法

1. マクロファージ様培養細胞(RAW264) を一つの well あたり 1×10^7 /2ml ずつ 6 well plate (平底) に必要 well 数用意する。評価する糖脂質 1 つあたり 2well 用意する。
2. 2 時間以上 37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートする。
3. 各 well の培地を捨てて、1ml ずつ新しい培地を入れる。
4. 残り 1ml 中に LPS(1 μ g/well)とオリーブの糖脂質を必要濃度に調整して各 well に加える。最終的に well あたり 2ml となるので、そのことを注意して調整する。
5. 24 時間培養後培養液 500 μ l を回収し、-20 $^{\circ}$ Cにて保存。培地上清は各種サイトカインアッセイに用いる。
6. 残った培地上清を完全に取り除き、細胞を PBS で 1 回洗浄し、TaKaRa の RNAiso を 1ml 加える。細胞が剥離したところでピペットで回収し、エップンドルフチューブへ移す。沈殿がある場合には沈殿がなくなるまでピペッティングを行う。
7. 室温で 5 分放置する。その後クロロホルムを 200 μ l 加えよく攪拌し、さらに室温で 5 分放置する。
8. 12,000 x g で 10 分間 4 $^{\circ}$ Cで遠心を行い、上清 500 μ l 回収する。これにイソプロパノール 500 μ l 加えてよく混ぜ、室温で 10 分間放置した後に 12,000 x g で 10 分間 4 $^{\circ}$ Cで遠心を行い RNA を沈殿させる。
9. 上清を捨て、75%冷エタノール 1ml を加えボルテックスで攪拌した後に、7,500 x g で 5 分間 4 $^{\circ}$ Cで遠心し上清を捨てる。その後室温で 10 分間乾燥させ、RNase-free water を 50 μ l 加えて溶解する。
10. インビトロジェン社の SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR キットを用いて 9. で取得した RNA を元に cDNA を合成する。
11. 10 で作成した cDNA を用いロッシュのユニバーサルプローブライブラリー#49 と TNF- α のプライマー(tctttctcattcctgcttgtgg および ggtctgggccatagaactga)を用いて RT-PCR を行い、TNF- α の定量を行う。定量値はコントロール(何も処理していないものおよび LPS だけで刺激したもの)の増幅開始点を比較することで行う。

4. 分析例

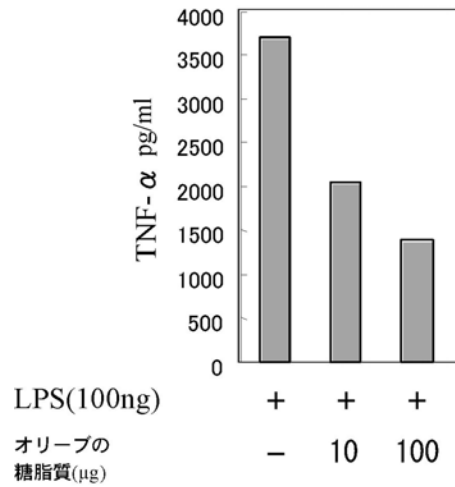


図 2 培養細胞を用いたオリーブの糖脂質の免疫系への活性

この結果から、オリーブの糖脂質は LPS によって引き起こされる TNF- α の抑制を行うことを示している。

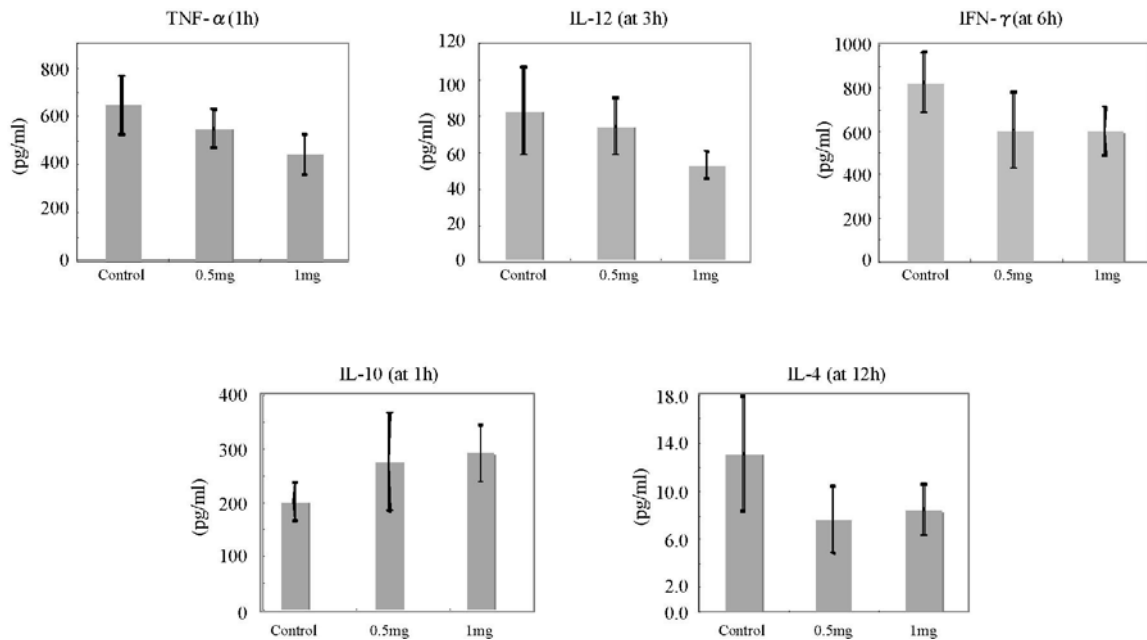


図 3 マウスを用いたオリーブの糖脂質の免疫系への影響

この結果は LPS 投与で上昇する自然免疫に関わるサイトカインを減少させる効果がオリーブの糖脂質にはあることを示している。

	TNF- α 増幅開始点
無添加	20.01
LPS 添加	16.16
オリーブ糖脂質と LPS の同時添加	17.20

表 1 mRNA 測定による培養細胞を用いたオリーブの糖脂質の免疫系への影響

増幅開始点は早いほど mRNA の量が多いことを示している。LPS 添加のものが、この中で一番早い増幅開始点を示すことから、LPS 添加時の TNF- α の生産量が多いことが分かる。対してオリーブを同時に加えたときは増幅開始点が遅くなっていることから、TNF- α の生産が抑えられていることが分かる。従って、この結果からも、オリーブの糖脂質は炎症抑制効果があることが分かる。

5. 分析上の留意、注意点

免疫系の指標となるサイトカインは微妙な条件により変動が激しく起こる性質を持つため、培養細胞・マウスの両方の手法において不純物の混入による変動に注意が必要である。

－以上－

[トップページに戻る](#)