
研究ノート

脱脂米糠抽出物のヒト由来食細胞に対する 免疫賦活性の検討

宮崎 由子・阿部 千秋*

Effects of degreasing rice bran extracts on immune response

Yoshiko Miyazaki, Chiaki Abe

The present report describes the effect of the three kinds of degreasing rice bran extracts (rice bran (Rb), rice bran extract E (RbE), and rice bran heat water extract (RbhS) on the immune response of human cells. Samples of Rb and RbE were processed by fermentation with *Enterococcus* sp. and *Pichia* sp. at 37°C for 3 to 5 days, subsequently, RbE samples were treated with hemicellulose enzyme. While RbhS samples were heat-treated and used as the control.

We studied the effect of inactive *Staphylococcus aureus* cells coated with the three kinds of rice bran extracts on phagocytosis and phagosome-lysosome fusion by human leukocytes *in vitro*. Rice bran extracts increased phagocytic activity and phagosome-lysosome fusion in neutrophils and monocytes in a dose-response manner. The rate of phagocytosis of RbE-coated *S. aureus* by neutrophils was significantly higher, by approximately 3.6 times, than that of uncoated *S. aureus*. The rate of phagocytosis of RbE-coated *S. aureus* by monocytes was about 1.6 times higher than that of the control. The phagosome-lysosome fusion index (FI) for RbE-coated bacteria by neutrophils was higher, by approximately 6 times, than that of the control. The ratio of the FI to the phagocytic index (PI) in human neutrophils showed that 83% of phagocytosed cells were digested the fused phagolysosomes when the *S. aureus* coated with RbE at a concentration of 25 µg/ml.

These results show that RbE has immune-enhancing activity. Although degreasing rice bran is traditionally discarded, if processed with *Enterococcus* sp., *Pichia* sp. and hemicellulose enzyme, it becomes consumable and can be used as a health food material to enhance immune activity in humans.

(Received October 19, 2011)

I. 緒言

米糠は、米などの穀物を精白した際に出る果皮や種皮、胚芽などの部分であり、米を主食とする我が国では多量の米糠が生じるが、ほとんどは廃棄されている。米糠には油分、タンパク質、食物繊維、ビタミン類、ミネラル類などの栄養素が豊富に含まれ、特に、米糠エキス水解物に含まれる水溶性食物繊維のアラビノキシランがよく知られ、便通改善や活性酸素除去作用及び免疫賦活作用などの生理機能を示すことが既に報告されている¹⁻¹¹⁾。また、米糠中に18%含まれる脂質は、米糠油として利用される一方、多くの脂質低下成分（オリザノール・ポリコサノール

ル・イノシトールなど）が健康補助食品として見直されている¹²⁾。米糠の主な用途は、米糠油原料33%、飼料原料12%、キノコ菌床11%、漬物5%であるが、残りの39%は廃棄されているのが現状である。米油製造の副産物である脱脂米糠には、タンパク質・食物繊維・ビタミン類などの栄養素が多く残存しているので、有効活用することはグリーンケミストリーの観点からも重要である。しかし、米糠の食品への利用が進んでいない理由には、米糠特有の好ましくない風味やざらざらとした舌触りなどが挙げられる。そのため風味や舌触りを改善した米糠製品の開発が多くなされているが、米糠の収率が低く、生理活性においても充分満足できる結果が得られていない¹³⁻¹⁶⁾。そこで、米糠を3種類の方法で処理し、各々の免疫賦活性を未利用資源の有効活用という観点から学術的に検討した。

京都女子大学家政学部食物栄養学科、

*立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科

II. 実験材料と実験方法

1) 実験材料

米糠抽出物を下記の処理方法で調製した脱脂米糠抽出物の3種(ライフベップ, ライフベップE, 米糠熱水抽出物)について実験を行った。実験材料は(株)ファーマフーズより寄与された試料を用いた。

a) ライフベップ (Rice bran extract : Rb)

水を加えた脱脂米糠に乳酸菌 *Enterococcus* sp. と酵母 *Pichia* sp. を植菌し, 30℃, 3~5日間培養し, 濾過後, 濾過液を凍結乾燥して調製した。発酵はpHの変化, タンパク質の分解(SDA-PAGE)を指標とした。発酵とともに, pHが徐々に減少し, タンパク質の分解は発酵後4日目で顕著に起こっていることを確認した。

酵母の単離については, 新鮮な脱脂米糠10gに生理食塩水10ml添加してよく攪拌した後, 遠心して上清を回収した。この上清を生理食塩水で段階希釈した液をポテトデキストロース寒天培地に播種し, 30℃で2~3日間培養した。出現したコロニーをピックしてポテトデキストロース液体培地に接種し, 30℃で1~3日間培養し, この培養液を生理食塩水で段階希釈して, ポテトデキストロース寒天培地に播種し, 30℃で2~3日間培養し, 出現したコロニーをピックして単離株とした。乳酸菌の単離には, 培地として炭酸カルシウム含有GYP培地を用いた以外は, 上記と同様にして米糠から乳酸菌を単離した。上記のようにして米糠から分離された酵母及び乳酸菌を用いることにより, 米糠を効率よく発酵させることができた。米糠1質量部に対し, 水を0.2~50質量部添加し, オートクレーブ処理により, 殺菌を行った。

b) ライフベップE (Rice bran extract E : RbE)

Rice bran extract Eは水を加えた脱脂米糠に乳酸菌と酵母を植菌し30℃, 3~5日間培養し, その後酵母処理後酵素(ヘミセルラーゼ)処理し, 濾過後, 濾過液を凍結乾燥して調製した。

c) 米糠熱水抽出物 (Rice bran heat water solution extract : RbhS)

水を加えた脱脂米糠を滅菌し, 遠心分離したものを濾過した。濾過後, 凍結乾燥した。

2) 実験方法

A. ライフベップ液の調製方法

3種のライフベップ(Rb・RbE・RbhS)は実験時に1mgを秤り, 0.1% Gelatin Hanks Buffer 1mlに混合し, 懸濁原液(1mg/ml)を作成し, 3種ライ

フベップ原液とした。各々のライフベップ原液を10倍希釈したものをライフベップ希釈液(100 μ g/ml)とした。その後, マイクロチューブに各濃度のライフベップ希釈液を加え, 黄色ブドウ球菌死菌体懸濁液を 1.0×10^8 個/mlになるように混合し, 0.1% Gelatin Hanks Bufferにて調製し, ボルテックスミキサーにて混合し, ライフベップ液(Rb・RbE・RbhS)とした。

B. 貪食活性の実験方法

免疫賦活性の指標として, ヒト白血球(好中球・単球)に対する貪食作用・食胞融合能の影響を検討した¹⁷⁾。ヒト末梢血より分離した好中球(5×10^6 個/ml)をcover slip上で90分間前培養後, 脱脂米糠から各々に調製した各ライフベップ混合液(Rb・RbE・RbhS)を黄色ブドウ球菌死菌体(1×10^8 個/ml)にコートして, 好中球に加えてインキュベートした。好中球の場合は37℃・60分培養し(単球の場合は, 37℃で180分), 貪食作用を調べた。その後, メタノールで固定し, さらにメチレンブルーで染色した後, 顕微鏡下で細胞内に貪食された菌数をカウントした。各濃度について無作為に240個(30個 \times 8ヶ所)の好中球を選び, その細胞内に貪食された菌数を数え, 平均値と標準偏差を求め貪食菌数とした。好中球および単球に貪食された菌数を貪食能とし, 試料の免疫活性化の指標とした。

C. 食胞融合能の実験方法

貪食実験と同様の方法で, ヒト好中球を分離しcover slipに吸着させた後, 5 μ g/mlアクリジンオレンジ液を加え, 37℃で15分間反応させ, 好中球のライゾゾームにプレラベルした。その後, 0~50.0 μ g/mlの各濃度に調製したライフベップE混合液(RbE)を加え, 37℃, 60分インキュベート後, 蛍光顕微鏡にて, アクリジンオレンジに染色された菌数を観察した。食胞融合能は100個以上の好中球を観察し, 1個当たりの好中球内で融合している細菌の平均数に融合が観察された好中球の割合を乗じて算出し, fusion index (FI)として評価した。

$$FI = (P-L \text{ fusion を示した菌の総数} / \text{好中球の総数}) \times (P-L \text{ fusion を示した好中球の総数} / \text{好中球の総数}) \times 100$$

さらに, メタノールで固定し, レフルメチレンブルーで染色後, 貪食活性を観察した。食胞融合能と同様に好中球数及び菌数を求め, 貪食活性の割合に対して貪食能を起こしている割合(PI)を求め, 貪食能に対して殺菌されている割合(FI/PI)を算出し比較検討した。

$$PI = (\text{貪食している菌の総数} / \text{好中球の総数}) \times (\text{貪食を示した好中球の総数} / \text{好中球の総数}) \times 100$$

Ⅲ. 結果および考察

脱脂米糠を乳酸菌と酵母で発酵した抽出物 (ライフベップ;Rb) とその後酵素処理した抽出物 (ライフベップE;RbE) および脱脂米糠の熱水抽出物 (Rbhs) の3種を試験試料とし、好中球および単球に対する貪食活性を検討した。各濃度について無作為に240個(30×8箇所)の好中球および単球を選び、その細胞内に貪食された菌数をカウントした。その菌数の平均値と標準偏差を求め、その結果をFig. 1に示した。

ヒト好中球に対する貪食活性は、3試料とも、濃度に依存して貪食作用を促進した。ライフベップE (RbE) では5 μg/mlでプラトーに達し、5 μg/mlの濃度でコントロール(0 μg/ml)に比べ3.6倍(p<0.001)の促進作用が認められた (Fig.1B)。ライフベップ (Rb) では25 μg/mlでプラトーに達し、コントロールの2.5倍 (p<0.001) の促進作用であった (Fig.1A)。乳酸菌や酵母で発酵していない熱水抽出物 (Rbhs) では、60 μg/mlの濃度において、コントロールに比べ2.7倍 (p<0.001) の貪食活性を示した。結果としてRbEの場合が最も貪食活性の促進を示した。

また、単球に対する貪食活性においても (Fig.1), 好中球の場合と同様な傾向を示した。RbE では1.5倍 (25 μg/ml, p<0.001) の貪食活性を示し、Rbは、1.6倍 (25 μg/ml, p<0.001) , Rbhsでは1.3倍 (60 μg/ml, p<0.001) の促進を示した。Rbhsに比べ、

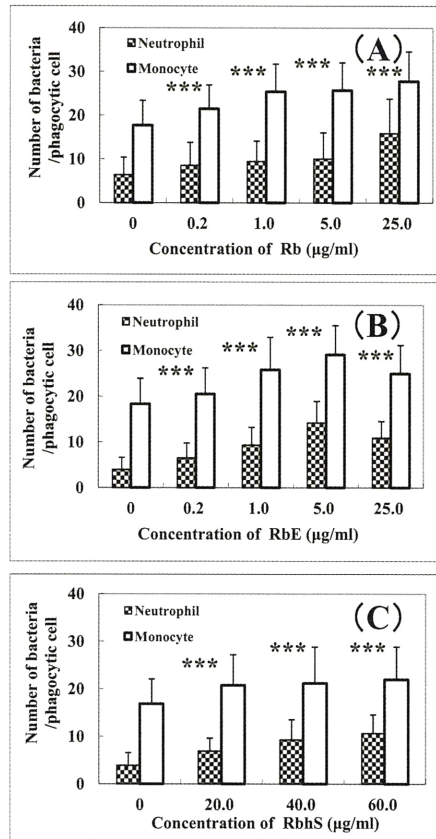


Fig. 1 Effect of rice bran extracts on phagocytosis by human neutrophils and monocytes. (A) Rice bran extract (Rb), (B) Rice bran extract E (RbE), (C) Rice bran heat water solution extract (Rbhs). Values represent mean ± SD. Significantly different from control, ***p<0.001

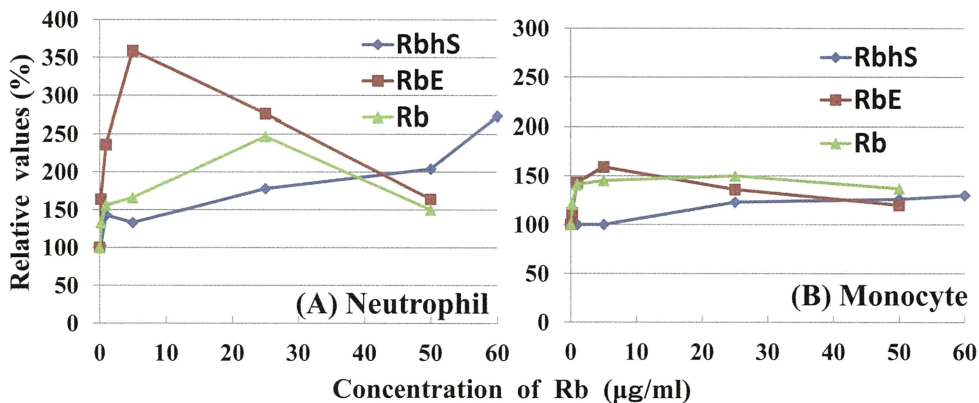


Fig. 2 Relative values of rice bran extracts on phagocytosis by human neutrophils (A) and monocytes (B).

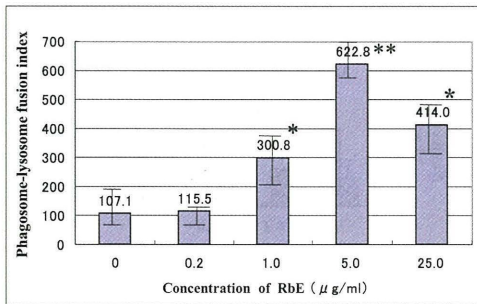


Fig. 3 Effect of rice bran extracts on phagosome-lysosome fusion by neutrophils. Values represent mean \pm SD. Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

RbEとRbに促進傾向が認められた。

次に、Rb及びRbE、RbhSの3種間を比較検討するために、コントロール値を100とした相対値で示した(Fig. 2)。その結果、RbEでは、未処理のRbhSより1/12量で活性を示し、また乳酸菌と酵母のみで処理したRbより、1/5量で活性を示し、ライフベップE(RbE)の貪食活性が最も強いことが認められた。

さらに、最も貪食活性の強かったRbEについて、食胞融合能を検討した(Fig.3)。その結果、RbE濃度に依存して食胞融合能の活性が上昇し、RbE濃度5 μ g/mlにおいてコントロールに対して6倍の食胞融合能を示した。

取り込まれた貪食細胞内において、どの程度殺菌しているかどうかを検討するために、食胞融合率/貪食率(FI/PI)を求め、貪食細胞内における殺菌能として、評価した(Table 1)。

Table 1に示したように、RbE濃度5 μ g/mlにおい

Table 1 The ratio of fusion index against phagocytic index of rice bran extracts-coated *S. aureus* in human monocytes.

Conc. of RbE (μ g/ml)	FI	PI	FI/PI
0	107.1	295.1	0.363
0.2	115.5	384.6	0.300
1.0	300.8	489.3	0.615
5.0	622.8	897.2	0.694
25.0	414.0	501.4	0.826

The fusion index (FI) was defined as the percentage of positive phagosome-lysosome fusion multiplied by the mean number of fused phagosomes per phagocyte. The phagocytic index (PI) was defined as the percentage of positive phagocytosis multiplied by the mean number of phagocytosed bacteria per phagocyte.

て、貪食細胞内において、69%が殺菌し、25 μ g/mlの濃度で約83%が殺菌されていることが確認できた。このことは、脱脂米糠を乳酸菌・酵母処理後、酵素(ヘミセルラーゼ)処理することによって、貪食活性および食胞融合能が促進することが明確となった。

以上のことから、米糠を乳酸菌・酵母処理後、ヘミセルラーゼ処理することによって米糠の有効活用が可能であることが示唆された。

IV. 要約

3種類の方法で調製した脱脂米糠抽出物について免疫賦活性(貪食活性と食胞融合性)の視点から、未利用資源としての活用可能性を検討した。

(1)ライフベップ(Rb)は乳酸菌・酵母処理(37°C・3~5日)。

(2)ライフベップE(RbE)は乳酸菌・酵母処理後酵素(ヘミセルラーゼ)処理。

(3)熱水抽出物(RbhS)はオートクレーブ処理。

何れの処理サンプルも、凍結乾燥後試験に供した。その結果、ヒト好中球に対する貪食活性は、3試料とも、濃度に依存して貪食作用が上昇した。RbEでは5 μ g/mlプラトーに達し、コントロールに比べ3.6倍($p < 0.001$)の活性を示した。また、単球に対する貪食活性では、RbEが1.6倍($p < 0.001$)活性を示した。RbEは、脱脂米糠の熱水抽出物(RbhS)とRbより高い活性を示した。

最も貪食活性の強かったRbEの食胞融合能は、コントロールに対して6倍の食胞融合性を示し、25 μ g/mlの濃度で貪食された菌のうち約8割が殺菌されることが確認できた。この結果、脱脂米糠を乳酸菌・酵母処理後酵素(ヘミセルラーゼ)処理すると、貪食活性を促進できることがわかり、免疫賦活作用を示す利用資源として役に立つことが明確となった。

謝辞

この研究は(株)ファーマフーズとの共同研究に伴う補助金により実施し、ご協力頂いた渡辺和哉、山口頂様に深謝いたします。

V. 引用文献

- 1) Ghoneum, M.: Enhancement of Natural Killer cell activity by modified Arabinoxylan from Rice Bran (MGN-3). *Int. Immunotherapy* **14**, 89-99 (1998).
- 2) Ghoneum, M.: Anti-HIV activity in vitro of MGN-

- 3, an activated Arabinoxylan from Rice Bran. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 25-29 (1998).
- 3) Ghoneum, M., and Brown, J. : NK immunorestitution of cancer patients by MGN-3, a modified Arabinoxylan from Rice Bran (Study of 32 patients followed for up to four years). *Anti-Aging Medical Therapeutics* **3**, 217-226 (1999).
- 4) Ghoneum, M. and Jewett, A. : Production of Tumor Necrosis Factor alpha and Interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified Arabinoxylan from Rice Bran, and its synergy with Interleukin-2 *in vitro*. *Cancer Detect. Prev.* **24**, 314-324 (2000).
- 5) Kubo, C., Sudo, N., XN Yu, Oyama, N., Nukina, H., and Hirayama, K. : Biophlatic enhancement effects of MGN-3. *Clinical and Research* **78**, 193-196 (2001).
- 6) Tazawa, K., Namikawa, H., Oida, N., Itoh, K., Yatsuzuka, M., Koike, J., Masada, M. and Maeda, H. : Scavenging activity of MGN-3 (Arabinoxylan from Rice Bran) with Natural Killer cell activity on free radicals. *Biotherapy* **14**, 493-495 (2000).
- 7) Ohara, I., Tabuchi, R. and Onai, K. : Effects of modified Rice Bran on serum lipid and taste preference in Stereptozerocin-induced diabetes rats. *Nutrition Res.* **20**, 59-68 (2000).
- 8) Jacoby, H., Wnorowski, G., Sakata, K. and Maeda, H. : The effect of MGN-3 on Cisplatin and Adriamycin induced toxicity in the rat. *Gastroenteology*, **118**, 49-62 (2000).
- 9) 長坂玲子, 潮秀樹 : 米糠の生活習慣病予防・改善効果, *Japan Food Science*, **45**, 72-74 (2006).
- 10) 前田浩明 : 米ぬかアラビノキシランの免疫賦活作用, *Food Style* **21**, **3**, 56-58 (1999).
- 11) 有村勉, 杉下朋子, 岡田忠司, 湯浅 (小島) 明子 : 発酵脱脂米糠抽出物の免疫賦活作用, 大阪市立大学生生活科学研究誌, **2**, 31-37 (2003).
- 12) 村上太郎, 青山千宏, 土橋確英 : ギャバ, オリザノール, フェルラ酸の機能と応用, *Food Style* **21**, **3**, 61-65 (1999).
- 13) 小川知彦, 山本浩代, 杉下朋子, 岡田忠司, 村井弘道 : 米糠の水抽出物を含有することを特徴とする免疫賦活用組成物, 特開2002 - 255843号公報
- 14) 向井新悟, 岡崎邦生, 井上里志, 日比野浩 : 米糠製品及び米糠製品の製造方法, 特開2002 - 265377号公報
- 15) 竹内政保, 中村信之 : トウモロコシ外皮由来の免疫賦活剤, 特開2001 - 322942号公報
- 16) 下村健次, 服部文弘 : 乳酸菌発酵代謝物を配合した免疫調整剤, 特開2002 - 37739号公報
- 17) Miyazaki Y., Kusano S., Doi H. and Aki Y. : Effects on immune response of antidiabetic ingredients from white-skinned sweet potato (*Ipomoea batatas*) *Nutrition* **21**, 358-362 (2005).