

氏名	影山 将克		
学位の種類	博 士 (環境学)		
学位記番号	博 甲 第 8 6 3 2 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	蜂の子の悪性腫瘍及びアトピー性皮膚炎に対する生理活性評価及びその免疫調節機能に関する研究		
主査	筑波大学教授	博士 (農学)	張 振亜
副査	筑波大学准教授	工学博士	雷 中方
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	清水 和哉
副査	鳥取大学農学部共同獣医学科准教授	博士 (獣医学)	杉山 晶彦

## 論 文 の 要 旨

本研究の背景は、世界人口の増加に伴う食糧問題に対して、未利用のタンパク源・食糧資源として昆虫食が注目されていることにある。昆虫食材である蜂の子は、栄養価が高く、中国最古の薬学書「神農本草経」にも収載され、東洋諸国で伝統的な代替医療に用いられてきた。しかし、養蜂における雄ミツバチは、生殖のみに使われており、利用価値は極めて低く、不要資源とされ養蜂業者の手を煩わす廃棄物となっている。以上から、著者は蜂の子の再利用や再資源化による蜂の子利用の拡大が、養蜂業の発展にも寄与できると考えた。蜂の子を使用した数多くの商品が健康食品となっているが、蜂の子の有効性についての科学的な検証は極めて少ないのが現状であった。このため本研究では、未解明な蜂の子の機能性を評価するために、蜂の子摂取による生理活性、特に免疫システムの破綻が一病因とされる悪性腫瘍に対する効果及びアトピー性皮膚炎に対する効果を明らかにした。

著者は、ミツバチ幼中を凍結乾燥した粉末（蜂の子末）と蜂の子凍結乾燥末を70%エタノールで抽出した試料（蜂の子抽出液）を調製し、本研究の評価の材料とした。

本論文の研究成果は以下の通りである。

1. 蜂の子は、CD4<sup>+</sup> 細胞を活性化することにより腫瘍の増殖・進展を抑制させる。

BALB/c マウスに乳がん細胞 (4T1-LUC) を皮下に接種し、蜂の子末摂取による抗腫瘍効果を評価した。この結果、蜂の子末摂取により腫瘍重量・体積は減少し、腫瘍内の壊死面積も増大し、血中 TNF- $\alpha$  の発現と血管新生が抑制された。加えて、メラノーマ細胞 (B16-F10) を用いた転移抑制についての評価では、蜂の子末摂取群において肺への転移が抑制され、抹消血球中の免疫細胞である CD4<sup>+</sup> 細胞が上昇した。従って、蜂の子は、CD4<sup>+</sup> 細胞を活性化することにより腫瘍の増殖・進展を抑制させることが示された。

2. 蜂の子抽出液による抗腫瘍メカニズムが EZH2 を介した免疫調節機能である。

蜂の子抽出液の添加濃度によらず、乳がん細胞 (MDA-MB-231、MCF7、4T1-LUC) やマウスメラノーマ細胞 (B16-F10)、ヒト正常線維芽細胞株 (TIG3)、ヒト胎児線維芽細胞株 (MRC5) の細胞存在率は、ほぼ一定で

あり、蜂の子自体に直接がん細胞を壊死させる作用はなく、正常細胞に対しても悪影響は認められなかった。著者はマクロファージ RAW264.7 細胞を用いて、生理活性評価を行った結果、蜂の子抽出液は RAW264.7 細胞の増殖を促進し、Doxorubicin 及び過酸化水素が誘発したストレスに対しては、細胞死を抑制した。また、リポ多糖の添加により RAW264.7 細胞の NO 及び IL-6 は増大したが、蜂の子抽出液を添加すると濃度依存的に NO 及び IL-6 の産生が抑制された。さらに、乳がん細胞 (4T1-LUC) とメラノーマ細胞 (B16-F10) を用いて蜂の子抽出液の添加が、ポリコーム群タンパク質 EZH2 に及ぼす影響を解析し、蜂の子抽出液の添加によって EZH2 の mRNA の発現が抑制される結果を得た。これは、根幹となる抗腫瘍メカニズムが EZH2 を介した免疫調節機能であることを示した。

3. 蜂の子末は、免疫の過剰反応を抑制し、NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎を改善する。

NC/Nga マウスを用いて蜂の子末摂取によるアトピー性皮膚炎の抑制効果を検証した。この結果、陽性コントロール群では顕著な皮膚炎徴候が認められたが、蜂の子末摂取群においては皮膚炎徴候を用量依存的に抑制した。摂取 46 日後では、非摂取群に比べて皮膚炎スコアや耳介の腫脹、皮膚の肥厚、炎症性細胞の湿潤、血清総 IgE、IL-4、IFN- $\gamma$ 、皮膚病態 IL-18、IL-12 の顕著な上昇抑制が認められた。よって、蜂の子末は免疫の過剰反応を抑制し、アトピー性皮膚炎の病態を軽減する機能があることを明らかにした。

4. 蜂の子末の経口摂取により、ヒト軽度アトピー性皮膚炎を改善する。

蜂の子末のヒトにおける有効性を検証するために、軽度アトピー性皮膚炎罹患者を対象に、1,000 mg/日の蜂の子末の摂取を 12 週間実施し、非特異的 IgE と血清 TARC 値の検査、及びアンケート調査、医師の問診により、アトピー性皮膚炎の改善効果を評価した。蜂の子末摂取前と比較して、摂取 12 週間後に非特異的 IgE が減少傾向を示したが、血清 TARC 値には変化はなかった。肌の痒み、頸部皮疹の面積は、摂取期間に依存的な改善がみられた。以上から、蜂の子末の継続的な摂取は、免疫の過剰反応を抑制し、アトピー素因や皮膚症状を改善することがわかった。

本論文の研究成果から、蜂の子は免疫の過剰反応を抑制することで、アトピー性皮膚炎を緩和する作用を示し、一方で悪性腫瘍に対しては免疫を活性化することで、抗腫瘍効果を示すという、免疫調節機能があることを明らかにした。さらに免疫調節の上流では、ポリコーム群タンパク質 EZH2 への関与が示され、蜂の子は、食料資源及び健康食品として人々の健康維持に寄与すると共に、今後、免疫調節機能の関与成分を特定することで副作用のない抗アトピー性皮膚炎や抗腫瘍剤としての開発の期待ができる。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、未解明な部分が多い蜂の子の機能性を評価し、免疫システムの破綻が一病因とされる悪性腫瘍に対する効果及びアトピー性皮膚炎に対する効果を、作用メカニズムを含めて解析している。

本論文は、蜂の子末は、免疫の過剰反応を抑制することで、アトピー性皮膚炎を緩和する作用を示す一方、悪性腫瘍に対して、免疫の活性化による抗腫瘍効果を示すという、免疫調節機能があることをつきとめている。さらに、免疫調節の上流では、ポリコーム群タンパク質 EZH2 の関与を示した。本研究成果によって、蜂の子は、食料資源及び健康食品として人々の健康維持に寄与すると共に、免疫調節機能に関与する蜂の子成分の特定により、副作用のない抗アトピー性皮膚炎や抗腫瘍剤を開発が期待できるという、蜂の子を原料とした機能性食品や医薬品の研究開発に重要かつ不可欠な情報を示した。

本論文は、オリジナリティに富む研究として高く評価され、蜂の子が免疫調節機能の効果を有することを明らかにし、生物資源の利活用に資する重要な成果を示し、特に機能性食品や医薬品研究分野への応用に科学的かつ技術的な助言を提供できたことも評価された。

平成 30 年 1 月 17 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判断された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。