

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500700
 研究課題名 (和文) 健康食品の免疫賦活効果に関する研究
 研究課題名 (英文) Immunostimulating effects of health foods on murine macrophage cell line
 研究代表者
 佐藤 勝昌 (SATO KATSUMASA)
 神戸女子大学・家政学部・教授
 研究者番号：00142331

研究成果の概要 (和文)：マウスマクロファージ細胞株を用いて、各種健康食品の免疫賦活効果について検討した。これらを細胞株の培養液に添加して、その効果の指標として細胞の形態変化を顕微鏡下で調べた。その結果、調べた健康食品のうちアガリクスと椎茸菌糸体抽出物 (LEM) において免疫賦活効果が期待できた。そこで、これらの抗 *Listeria monocytogenes* 活性について検討した。アガリクス処理細胞は非処理細胞におけるよりも抗 *Listeria* 活性を上昇させ、これは活性酸素依存性であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Immunostimulating effects of various health foods were studied using murine macrophage cell line. These foods were added to the culture medium of the cell line, and, as an index of the effects, morphological changes of the cell were searched under the microscope. As a result, among the health foods tested, immunostimulating effects could be expected in agaricus and extracts from *Lentinula edodes* mycelia (LEM). Next, anti-*Listeria monocytogenes* activities of these foods were examined. The agaricus-treated cells had increased anti-*Listeria* activity than the non-treated cells, which was suggested to derive from active oxygen dependence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬によって感染症は過去のものだと言われた時代もあったが、医学の進んだ現代でも感染症は珍しくなく、命を失う人も少なくない。このことは抗菌薬に依存した細菌感染症の治療法の限界を示唆しており、感染菌の排除のためには抗菌薬に加えて宿主側の免疫能を積極的に利用する手段も必要である。

前任校では、難治性抗酸菌感染症である *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症に関して種々のテーマで研究を行い、その中でも MAC 症の化学療法は重要なテーマの1つであったが、有効な抗菌薬を見出すことは出来なかった。現在も MAC 症の治療に有効な新規抗菌薬の開発はある程度進められているものの、臨床試験に供されているものは皆無である。そこで、現時点では既存の抗菌薬による多剤併用療法に加えて、何らかの免疫修飾剤を用いての免疫補助療法を施行することが最も現実的且つ有効な手段であるといえる。

これまでの研究チームでは、こうした観点から MAC に対する標準治療法を修飾又は代替出来る安価で毒性のない免疫修飾剤などについても検討してきたが、数種の漢方薬に MAC 菌に対する免疫を up-regulate する作用があることを見出しているだけである。なお、難治性抗酸菌感染症の免疫補助療法については、サイトカインなども含めた多くの薬剤を用いての研究・臨床試験が国内外で行われているが、安全・低価格・持続性のある温和な免疫増強作用発現といった条件を満たすような免疫補助療法は未だ知られていない。

上述についてさらに進展させるべく研究を進めていたが、平成 18 年 4 月より研究代表者の勤務先が家政学部管理栄養士養成課程に変わり、従来の医学部での研究環境が全く得られない状況となった。これに伴って、これまでの研究テーマの見直しの必要性に迫られ、新任校が「食」と密接に関わっているという特殊性を考慮して、これまでの研究業績を活かすべく、食品自身あるいは食品中のある種の成分の免疫賦活効果についての検討を行うこととした。即ち、宿主の免疫能を増強させる作用があるとして多くのいわゆる「健康食品」（特定保健用食品及び栄養機能食品を含む）が販売され、多くの人に利

用されているが、これらが真に免疫増強作用を有しているか否かについては多くの疑問があり、このような観点から研究を行うこととした。今回、この免疫増強能の最終的な判定は、リステリア感染に対する抵抗性増強作用の有無を調べることで検討することとした。

2. 研究の目的

免疫系は進化の過程で腸管において発達し、いまや免疫系全体の 50% 以上のリンパ球や抗体が腸管に存在して腸管免疫系を形成していると言われている。免疫系は自己と非自己を認識し、体外からのさまざまな異物を排除する機構であるが、我々が日常的に摂取している食物中には膨大な量のタンパク質が含まれているにも関わらず、人の免疫系は口から摂取したタンパク質や腸内の常在細菌叢を非自己として認識しない仕組みを獲得している。つまり、この腸管免疫系の大きな特色は身体にとって益となる食物（食物成分）や腸内共生細菌などと、逆に害を与える病原細菌等を識別していることである。このような経口摂取されたタンパク質に対して免疫応答が起こらないのは「経口免疫寛容」と言われるが、この機構が何らかの原因で失われた時やバランスを失った時に、食物アレルギーが起きると言われている。また、食中毒を含めて多くの感染症の約 8 割は腸管から感染するが、この腸管免疫系の強弱が感染するか否かを決定していると言っても過言ではない。従って、常に腸管免疫系を健康な状態に保つことが重要であり、そのためには腸管免疫系を活性化する食品の摂取が大切である。

現在、医薬品以外で宿主の免疫能を増強させる作用があるとして多くのいわゆる「健康食品」が販売され、多くの人に利用されているが、これらが真に免疫増強能を有しているか否かについての体系的な研究はほとんどなされていない。そこで、今回の検討では、種々の健康食品類の免疫増強能の有無を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞

マウスマクロファージ細胞株 J774.1 を 10% FBS-RPMI 1640 培地中で 5 日培養 (37°C, 5% CO₂ 下) したものをを用いた。

(2) 健康食品類

アガリクス、椎茸菌糸体抽出物 (LEM), ラクトフェリン, α -グルカン, アスコルビン酸 (ビタミン C), 塩化カルニチン (ビタミン Bt) を供試した。

(3) マクロファージの活性化の指標としての細胞の形態学的変化

細胞を 10% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させ、その 1 ml (2.5×10^5 cells/well) を予めプラスチックシートを入れた 24 well plate へ加え、5% CO₂ 下で 37°C, 1 日培養した。次いで、培養液を除去した後に 2% FBS-HBSS で細胞を洗浄し、2% FBS-RPMI1640 培地で所定の濃度になるように溶解した各種の健康食品類を加えた。3 日間にわたる培養期間中、所定日に培養液からプラスチックシートを抜き取り、PBS で洗浄し、メタノール固定後にギムザ染色を施して細胞の形態を顕微鏡下で観察した。

(4) 抗リステリア活性の測定

細胞を 10% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させ、その $200 \cdot \cdot 1$ (5×10^4 cells/well) を平底 96 well plate へ加え、5% CO₂ 下で 37°C, 1 日培養した。次いで、培養液を除去した後に 2% FBS-HBSS で細胞を洗浄し、2% FBS-RPMI 1640 培地に溶解した各 1 mg/ml のアガリクス, LEM, 及びラクトフェリンの $200 \cdot \cdot 1$ を加えた。5% CO₂ 下で 37°C, 1 日培養後、培養液を除去し、2% FBS-HBSS で洗浄後に 2% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させた *Listeria monocytogenes* EGD 株の $200 \cdot \cdot 1$ (2×10^3 CFU/well) を加えた。3 時間培養後に 0.23% sodium dodecyl sulfate (SDS) の $80 \cdot 1$ を各 well に加えて細胞を溶解させた後、これを 20% BSA-PBS ($120 \cdot 1$) で混じることにより SDS を中和させた。次いで、PBS の $600 \cdot 1$ を加えた後、PBS で 10 倍階段希釈を行い、その 0.5 ml をシャーレに注ぎ、約 10 ml のトリプトソイ寒天培地を加えた。37°C で 2 日培養後にコロニーをカウントすることにより健康食品類の抗リステリア活性を計測した。

(5) マクロファージの NO₂⁻産生能

上述と同様な方法で細胞をアガリクス及び LEM で処理した後、2% FBS-HBSS で細胞を洗浄し、2% FBS-RPMI 1640 培地の $200 \cdot 1$ を加えた。その後、 $10 \cdot 1$ の *Listeria*

monocytogenes (2×10^3 CFU/well あるいは 1×10^7 CFU/well) を加えて 37°C, 5% CO₂ 下で 3 時間培養し、その培養上清中の NO₂⁻濃度を Griess 法により測定 (550 nm) した。

(6) マクロファージの O₂⁻産生能

上述と同様な方法で細胞をアガリクス及び LEM で処理した後、HBSS (フェノールレッド不含: PR free) で洗浄し、 $80 \cdot M$ cytochrome C 含有 HBSS (PR free) の $200 \cdot 1$ を加えた。その後、上述と同様に *Listeria monocytogenes* を加えて 37°C で 90 分間培養し、その培養上清について O₂⁻産生量を測定 (550 nm) した。

4. 研究成果

(1) 健康食品類によるマクロファージの活性化

陽性コントロールとして LPS ($1 \cdot g/ml$) を供試細胞株に添加した場合、round 型の細胞形態であったものが、培養 1 日後には細胞の 95% が著しく伸展し ruffle 形成を示した。これに対して、非処理細胞株の ruffle 形成は 2% 程度であった。

同様な現象は、アガリクス ($1 mg/ml$), LEM ($1 mg/ml$), 及びラクトフェリン ($1 mg/ml$) においても認められ、いずれの場合も約 30~40% の細胞において ruffle 形成が認められた。これらの場合、3 日間の培養期間中、培養の経過と共にその ruffle 形成は低下傾向にあった。なお、ラクトフェリンでは培養 2 日後になると、付着細胞をほとんど認めることが出来なかった。しかしながら、ラクトフェリン以外については、付着細胞数の著大な減少は認められなかった。

他の供試健康食品類においては、同様な現象を認めることが出来なかった。

これらの結果から、細胞の形態変化を指標とした場合、特にアガリクス, LEM, 及びラクトフェリンにおいて、マクロファージ機能を亢進させる作用を有している可能性が示唆された。しかしながら、ラクトフェリンでは機序は不明だが、何らかの細胞毒性が認められることを示唆する成績が得られた。

(2) マクロファージの抗リステリア活性に及ぼすアガリクス, LEM, 及びラクトフェリンの影響

前述の結果からアガリクス, LEM, 及びラクトフェリンについて、これらで処理されたマクロファージの抗リステリア活性についての検討を行った。

供試細胞へのリステリア感染直後の well 内の菌数を 100%とした時、感染 3 時間後の菌数は、非処理対照群で 142%, アガリクス処理群で 127%, LEM で 135%, 及びラクトフェリンで 181%であった。このことから、アガリクス処理によってマクロファージの抗リステリア活性は約 15 ポイント亢進し、同様に LEM 処理では 7 ポイント亢進することが分かった。しかしながら、逆にラクトフェリンの場合にはリステリア菌数が増加する現象が認められた。これは上述の培養 2 日後になると付着細胞がほとんどみられなくなるということと軌を一にするかもしれない。

今回の検討から、マクロファージの抗リステリア活性を指標とした場合、特にアガリクスと LEM において、マクロファージの機能を亢進させる作用を有していることが示唆された。

(3) マクロファージの NO₂⁻産生能に及ぼすアガリクス及び LEM の影響

アガリクスあるいは LEM 処理マクロファージが抗リステリア活性を亢進させることが分かったので、その機序を解明するためにマクロファージの NO₂⁻産生能について検討してみた。

マクロファージをアガリクスあるいは LEM で処理しても NO₂⁻産生は全く認められなかった。そこで、これら処理マクロファージをリステリア菌で刺激してみたが、この場合にも NO₂⁻産生は全く認めることができなかった。

これらの結果は、マクロファージの抗リステリア抗菌力の増強には、NO₂⁻は関与していない可能性が強く示唆されるものと考えられる。

(4) マクロファージの O₂⁻産生能に及ぼすアガリクス及び LEM の影響

上述と同様に、マクロファージの抗リステリア抗菌力の増強のメカニズムを解明するために、マクロファージの O₂⁻産生能について検討してみた。

その結果、マクロファージをアガリクスあるいは LEM で処理しても O₂⁻産生は全く認められなかった。そこで、上述と同様にリステリア菌で刺激してみたところ、これら処理マクロファージにおいて非処理マクロファージにおけるよりも O₂⁻産生能が亢進していることが分かった。両者のうちでも、若干程度ではあるが、アガリクス処理マクロファージの増強作用が強い傾向にあった。

これらの結果は、マクロファージの抗リステリア抗菌力の増強には O₂⁻が関与している

可能性が強く示唆されるものと考えられる。

如上の成績より、今回供試した健康食品類の中でも、アガリクスと LEM, 特にアガリクスが宿主の免疫能を増強させる作用が強いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Shimizu T, Yasumoto K, Tatano Y, Tomioka H, Sato K, Sano C, Kumon H, Monden K: *In vitro* drug susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG Connaught and Tokyo strains. *Journal of Infection* (査読あり) 2010; 60: 248-251.
- ② 三原純子, 佐藤誓子, 清水典子, 佐藤勝昌: ある妊婦の 217 日間にわたる栄養摂取量—2010 年版食事摂取基準との比較—。神戸女子大学家政学部紀要 (学内査読あり) 2010; 43: 21-30.
- ③ Dimova V, Atanasova I, Tomioka H, Sato K, Reddy V, Nadadhur G, Daneluzzi D, Gangadharam PR, Kantardjiev T, Dhople A, Feshchenko Y, Yashino L, Toumanov A, hivkova Zv: Experimental and clinical studies on Rifacinna -The new effective antituberculous drug (Review), *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery* (査読あり) 2010; 5: 76-90.
- ④ Tatano Y, Yasumoto K, Shimizu T, Sano C, Sato K, Yano S, Takeyama H, Tomioka H: Comparative study for the virulence of *Mycobacterium avium* isolates from patients with nodular- bronchiectasis- and cavitarytype diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (査読あり) 2010; in press.
- ⑤ 佐藤誓子, 佐藤勝昌, 増澤康男: 食物アレルギーに対する保育所の給食対応—除去食・代替食提供時の工夫と配慮のあり方を中心として—, *栄養学雑誌* (査読あり) 2010; 68: in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勝昌 (SATO KATSUMASA)

神戸女子大学・家政学部・教授
研究者番号：00142331

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

瀬口 春道 (SEGUCHI HARUMICHI)
神戸女子大学・健康福祉学部・教授
研究者番号：90030866

岩阪 由位子 (IWASAKA YUMIKO)
神戸女子大学・家政学部・助手
研究者番号：90299082

八木 真知子 (YAGI MACHIKO)
神戸女子大学・家政学部・助手
研究者番号：50388782

(注：2008年に退職のため、2009年より
連携研究者から外す)