

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700577

研究課題名 (和文) 各種食品成分との相互作用による機能性糖鎖の免疫調節機能の増強と展開

研究課題名 (英文) Augmentation of an immunomodulating activities of functional polysaccharides by an interactive effect with food factors

研究代表者

湊 健一郎 (MINATO KEN-ICHIRO)

宮城大学・食産業学部・講師

研究者番号：10341728

研究成果の概要 (和文)：

本研究での結果より、免疫調節作用が注目されている食用キノコ中機能性糖鎖は、その生理活性が他の食品因子との相互作用を介して調節されていること、また調理方法の違いによる影響をさほど受けないことが明らかとなった。このことにより、普段の食生活 (食習慣) による摂食によって、その免疫調節機能が十分発揮できることが示され、疾病予防が期待される機能性食品素材として非常に有用なものであると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

It was shown that an immunomodulating activity of functional polysaccharides from edible mushrooms was regulated by some kinds of food factors, such as guanylic acid and vitamin D₂, through their interaction. However, it was suggested that their immunomodulating activities were not changed by a differentiation of processing. This work suggested that functional polysaccharides were effective on prevention from disease in our life because of maintenance of their immunomodulating activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	630,000	3,730,000

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：調理と機能性成分，機能性糖鎖，免疫調節機能，成分間相互作用

1. 研究開始当初の背景

食品成分中の機能性糖鎖の代表的なものとして、シイタケ (Chihara et al., 1969) やエノキタケ (Ikekawa et al., 1969) などキノコ中抗腫瘍性 β -1,3-グルカンがある。これらを筆頭にして、多くの食用農水産物から様々な機能性糖鎖の生理活性が、国内を始め中国、韓国などのグループを中心に示

ノコ中抗腫瘍性 β -1,3-グルカンがある。これらを筆頭にして、多くの食用農水産物から様々な機能性糖鎖の生理活性が、国内を始め中国、韓国などのグループを中心に示

されていた (Gao et al., 2005, Nanba and Kuroda, 1987, 1988, Liu et al., 1996, Okazaki et al., 1995)。

われわれもこれまでいくつかの食用キノコを中心に、食品由来の機能性糖鎖の免疫調節機能を調査してきており、これら機能性糖鎖の多くはキノコや海藻など日常的に口にする食品中の成分であるため、「医食同源」の観点からも重要な機能性成分であると考えた。しかし、それらを普通の食生活において、「一般的な食品」として摂食して健康維持や生活習慣病などの疾病からの予防・改善効果を期待するためには以下の点を明らかにして、調理方法や他の食材との組み合わせ（食べ合わせ）などにおいて、「効果的な食べ方」を新たに示す必要があった。

- (1) 貯蔵方法および調理方法により、機能性糖鎖の免疫調節機能が変化するかどうか。
- (2) 他の食品との組み合わせの違いにより、機能性糖鎖の免疫調節機能が変化するかどうか。
- (3) 副作用が無く、健康な生体には影響を及ぼさないかどうか。

研究代表者はすでに機能性糖鎖を含む食品を貯蔵・調理しても、その作用が変化しないことを示す必要があると考えて、これまでにいくつかの調査結果を報告していた。それによるとキノコなど機能性糖鎖を含む食品は貯蔵中の劣化に伴って、それらの免疫調節機能が低下する。しかしながら、それは食品中の機能性糖鎖が酵素的分解作用を受けて量が減少することが原因であり、糖鎖自体の機能は変化しないということが明らかとなっていた。また、それら機能性糖鎖は熱水により抽出・分離されるため、一般的な調理方法である加熱処理にも、比較的安定性を示すことが推測できた。そのため本研究では特に(2)の課題について調査することとした。

2. 研究の目的

本研究では機能性糖鎖と他の成分との効果的な組み合わせを明らかにすることを試みた。酵素など機能性タンパク質は補酵素な

どその他の成分と相互作用を起こして活性化されるため、機能性糖鎖においても他の食品成分との相互作用により本来持っている機能が增強するかどうかを焦点にして調査することを企画した。また我が国では、花粉症など成人してからの免疫機構崩壊による疾患が激増していることが問題になりつつある。さらに急速な高齢化も進んでいるため、「加齢に伴う老化による生体内の免疫機構崩壊」を防ぐための有効な手段を提示することも、早急に必要であると考えられたため、これらの点を踏まえて本研究期間内では、申すでいくつかの免疫調節機能を確認している食品（食用キノコや海藻類）由来の機能性糖鎖について、以下の点について調査して研究を展開していくことを検討した。

- (1) 他の食品成分との相互作用による、機能性糖鎖の免疫調節機能の增強効果

機能性糖鎖はそれを含む食品中においても、調理中においても、様々な食品成分と接しており、それらとの間に相互作用をおこす機会を常に持っている。そのため本研究では、食品に含まれる他の成分との相互作用が、それらの生理活性にどのように影響するのか糖鎖の免疫調節機能の增強を指標にして調べることを企画した。免疫調節機能とは、生体内の免疫担当細胞（マクロファージ、T細胞、B細胞、樹状細胞など）をバランスよく分布させて活性化することで、恒常性を維持するための生体防御機能である。これらの細胞群の調節（増殖、活性化および抑制さらには局在化など）には腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、インターロイキン(IL)類、インターフェロン (IFN) 類、ケモカイン類などのサイトカインと呼ばれる生理活性タンパク質が形成するネットワークを介した調節機構が密接に関与している。そこで本研究では免疫担当細胞および実験動物を用いて、分泌されるサイトカイン、もしくは免疫担当細胞の分布バランスを測定することとした。

成分間相互作用による機能性糖鎖の免疫調節機能增強効果を確認することは、糖鎖の機能変化を新たに発見・確認できるのみならず、機能性糖鎖との間で有用な相乗効果を示す食品成分を明らかにできると考え、このこ

とは、「糖鎖とタンパク質」といった食品中成分間の単純な組み合わせにとどまらず、機能性をさらに高めることができる食材の組み合わせの提唱への発展につながると期待した。つまり、「キノコや海藻を使ったこのような料理を食べれば生活習慣病予防に効果的である」などという、「食べ合わせ」に関する提案を可能にする研究結果となることを期待した。

(2) 老化に伴う免疫調節機構崩壊に対する機能性糖鎖の抑制効果

免疫調節機能は、年齢、性別やそのときの体の状態によっても変化すると考えられる。特に年齢による差は大きく、例えば幼年期のアレルギーなど「間違った免疫応答」が正常なものと認識されて体内で永久的に記憶されるような場合だと、それを直ちに正常に戻すような調節が必要になる。また花粉症など、加齢に伴いこれまで正常に応答していた機構が破壊されてしまうような場合には、その壊れた免疫機構カスケード（経路）を修繕するような機能が必要になると考えられる。超高齢社会に突入した我が国の大きな課題となるであろうこの老化による免疫機構の破壊に関しては、特にその予防・改善のために今後多くの研究結果の蓄積が必要になってくることが予想されたため、本研究では高齢の実験動物に対する機能性糖鎖の免疫調節（修繕）機能を調べて、高齢者対象の機能性食品開発の一助とすることも当初の目標としていた。

本研究での成果により、我々が生涯を通して健康であり続けるための「メニュー」や「食べ方」を示すことができると考えており、そしてそれは、「食育」をすべての年代の人たちに実施するという観点から、非常に有意義なことであると期待した。つまり本研究で得られる結果を基にした調理方法や食べ合わせなど「食べ方」の工夫によって、生体内の免疫機構を正常に維持し、生活習慣病予防が期待できることの証明を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 機能性糖鎖の調製

食用キノコであるタモギタケおよびナメコ子実体から熱水抽出後エタノール添加により沈殿画分を得た。この沈殿物をさらにイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除ゲルクロマトグラフィーによって分離・精製して、マクロファージ様細胞株 RAW264（理化学研究所バイオリソースセンターより入手）に対する TNF- α およびシグナルメッセンジャーである Nitric oxide (NO) 産生能を指標にして、最も活性の高かった画分を調製した。これらの画分を FT-IR（フーリエ変換型赤外分光器）分析、NMR（核磁気共鳴分光）分析および GC による構成糖分析により、それらを多糖であることを確認して本研究に供した。

(2) 機能性糖鎖とその他食品成分間の相互作用および調理条件

以下のような条件で混合試料を調製した。

- ① 混合のみ
- ② 加熱のみ
- ③ 酢酸添加
- ④ 酢酸添加後加熱

(3) マクロファージおよび単球に対する免疫調節作用

本実験で供した培養細胞株は全て理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。これらの細胞を RPMI1640 培地で一定期間培養後実験に供した。各培養細胞を糖鎖試料および各種食品因子（グルタミン酸、ビタミン D₂）で一定時間刺激した後、分泌されたサイトカイン類を L929 細胞株を用いた細胞障害活性またはフローサイトメーターを用いた CBA (Cytometric Bead Array) 法により測定、定量した。また mRNA の発現パターンを半定量的 RT-PCR により解析した。

(4) 脾リンパ球の免疫調節機能に対する影響

BALB/c マウスを用いて、試料添加飼料を自由摂食により与えて体内での免疫担当脾リンパ球細胞 (CD4⁺, CD8⁺) の分布状態の変化をフローサイトメーターにより解析した。また本研究では、崩れた Th1/Th2 バランスを元に戻す働きが期待できるかどうか、Th 細胞分化に関与するサイトカイン類の分泌パターンを指標にして、試料摂食後のマウス体内より

調製した脾リンパ球を一定時間培養した後、産生されるサイトカイン類をウエスタンブロット法により測定した。

(5) 単球のマクロファージ分化に対する機能性糖鎖の影響

単球細胞株である THP-1 細胞を PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 処理によりマクロファージ様細胞に分化誘導する際、機能性糖鎖を添加して M1 (Classically activated macrophage) / M2 (Alternatively activated macrophage) 分化に対する影響をフローサイトメーターを用いた細胞内蓄積サイトカインの測定により分析した。

4. 研究成果

(1) 機能性糖鎖の免疫調節作用

① マクロファージに対する免疫調節作用

本研究では食用キノコであるタモギタケおよびナメコから熱水抽出し、さらに各種クロマトグラフィー（イオン交換，ゲルろ過クロマトグラフィー）により分離・精製した多糖画分を用いた。CBA 法を用いた解析により、これらの多糖は免疫担当細胞であるマクロファージを刺激し，TNF- α や IP-10 (Interferon inducible protein-10) などの Th1 タイプのサイトカインの産生を誘導することが示された（表 1）。

表1. タモギタケ中多糖の刺激によるマクロファージ由来Th-1型サイトカイン産生

	TNF- α (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	NO (μ M)
THP-1				
control	150.5 \pm 47.1	n.d.	0.27 \pm 0.03	2.9 \pm 0.7
タモギタケ	705.8 \pm 89.0	n.d.	1.43 \pm 0.32	5.4 \pm 1.6
U937				
Control	16.1 \pm 13.0	9.4 \pm 3.2	11.6 \pm 1.6	n.d.
タモギタケ	174.1 \pm 64.8	11.8 \pm 1.8	13.9 \pm 1.9	n.d.

さらに，単球系細胞 THP-1 を用いたマクロファージ細胞分化能に対する機能性糖鎖の影響を調べた結果，タモギタケ中多糖がどのような影響を持つのか，フローサイトメーターを用いた産生サイトカイン測定により調査した。その結果，IL-12 を生産・分泌する

古典的活性化マクロファージ (M1) への分化を誘導することが明らかとなった。また，ナメコから抽出された多糖においても同様に調査した結果，同じく M1 マクロファージへの分化が誘導された (図 1)。

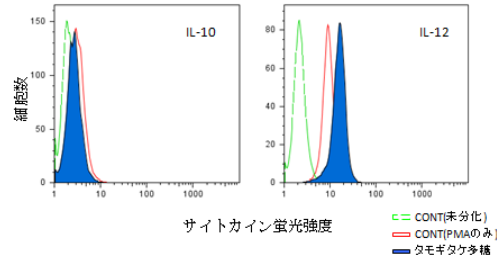


図1. タモギタケ中多糖のマクロファージ分化に対する影響

② マウス脾臓中リンパ球に対する免疫調節作用

機能性多糖成分を含む食用キノコ，ナメコ子実体を BALB/c マウスに一定期間摂食させた後の，生体内リンパ球の分布とサイトカイン産生パターンを，それぞれ脾 T 細胞の FACS 解析およびウエスタンブロット法により測定した。それらの結果，ナメコ摂食マウスでは IFN- γ 産生の増強と IL-4 産生の抑制という Th1 優位の生体内変化がおこることが示された (図 2)。

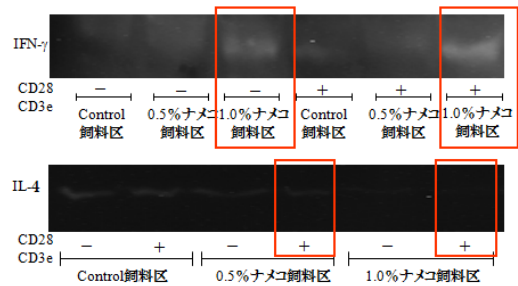


図2. ナメコ摂食によるBALB/cマウス脾リンパ球のIFN- γ とIL-4産生能への影響 (CD28-clone:37.51, CD3e-clone:145-2C11)

	TNF- α (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	NO (μ M)
U937				
Control	16.1 \pm 13.0	9.4 \pm 3.2	11.6 \pm 1.6	n.d.
タモギタケ	174.1 \pm 64.8	11.8 \pm 1.8	13.9 \pm 1.9	n.d.

上記機能性多糖とその他食品中成分（遊離アミノ酸，核酸，ビタミン類）とを混合し，その混合物でマクロファージを刺激して，糖鎖

とそれ以外の物質との相互作用による免疫調節作用を調べた (図 3, 4)。

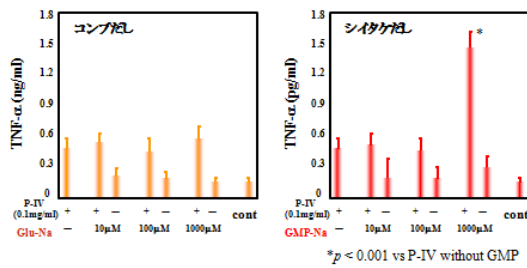


図3. タモギタケ中多糖画分の作用に対するうま味成分の影響

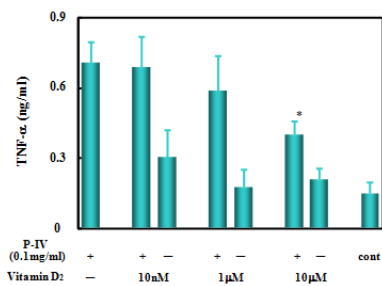


図4. タモギタケ中多糖画分の作用に対するビタミンD₂の影響
**p* < 0.001 vs P-IV without D₂

その結果、特に核酸であるグアニル酸 (5' -GMP-Na) が、本糖鎖が従来持っている免疫調節作用である Th1 タイプサイトカイン産生誘導作用をさらに増強させることが明らかとなった。一方、ビタミン D₂ との混合物で刺激した場合は、その作用が抑制されるという結果が得られた。しかしながら、この効果はサイトカインの過剰分泌を制御する可能性があり、生体内の Th1/Th2 バランスの維持という点から非常に興味深い知見であると考えられる。本実験の結果より、機能性糖鎖と核酸という組み合わせでは、糖鎖が持っている機能性を増強し、糖鎖とビタミン D₂ という組み合わせでは抑制効果が得られるということが明らかとなった。ところで、グアニル酸はうま味成分として食品加工や調理においては欠かせない重要成分である。またビタミン D には、カルシウムの利用を促進するという生理作用があり、我々も日常的に食品より摂取している。これらのことより、それぞれの成分を含んだ食品をバランス良く摂取

することにより、生体の免疫機能を調節できる可能性が示唆された。

本研究ではこれらのほかにも腸管上皮細胞 (Caco-2) とマクロファージに分化した THP-1 細胞との共培養系を用いて、それらの協調作用を調査した。その結果、グアニル酸との協調作用により、本多糖は腸管上皮細胞の活性を介したマクロファージの Th1 型サイトカインの産生能増強効果が認められた。これらの結果より機能性糖鎖はその他食品成分との協調作用によって、摂食後腸管免疫系の刺激を介した生体内の Th1/Th2 バランスの維持をおこなう可能性が示唆された。さらに以上のことより、機能性糖鎖は食品として摂取された後、それ以外の成分との協調作用により、生体内免疫系を調節している可能性が示唆された。

(3) 調理方法の違いによる機能性糖鎖の免疫調節作用への影響

食品は様々な加工・調理を施した上で摂取される。そのうち加熱調理というのは、最も一般的な方法である。そのため上記機能性多糖に加熱処理を施して、その免疫調節作用 (M1 マクロファージ分化効果) が変化するかどうか調査した。その結果、加熱処理をしてもキノコ中機能性多糖の上記作用は維持されていた (図 5)。

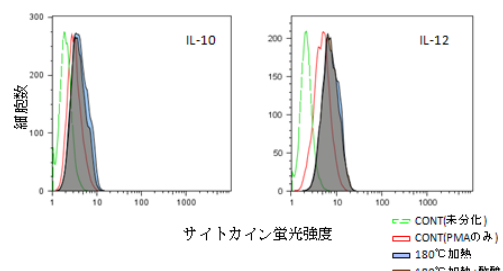


図5. タモギタケ中多糖の加熱によるマクロファージ分化に対する影響

尚、本研究期間においては加齢に伴う状態変化について、飼育途中の死亡による脱落など実験動物を同じ老化状態にすることが困難であったため、十分な調査評価系が確立できず、老化との関連性については不明瞭なままであった。この点については今後に残され

た重要な課題であるため、今後さらに調査結果を蓄積していき詳細な検討をおこないたいと考えている。

【まとめ】

本研究での結果より、機能性が注目されている食用キノコ中機能性糖鎖は、その生理活性が他の食品因子との相互作用を介して調節されていること、また調理方法の違いによる影響をさほど受けないことが明らかとなった。このことにより、普段の食生活（食習慣）による摂食によって、その免疫調節機能が十分発揮できることが示され、疾病予防が期待される機能性食品素材として非常に有用なものであると考えられた。

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 3 件）

- ① 湊健一郎，ナメコに期待されるガンや生活習慣病予防のための免疫調節作用，特産情報，査読無 2009年8月号，p26-28，2009
- ② Minato K.，A polysaccharide fraction from an edible mushroom, *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* stimulates an immunomodulating action of murine macrophage, RAW264, on TNF- α and NO productions in vitro., *Int. J. Medicin. Mushrooms* 査読有 10 (3) 235-244, 2008
- ③ Minato K., and Abe C., An immunomodulating action of a polysaccharide fraction from an edible mushroom, *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 査読有 43 Supple. 1, 359-362, 2008

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 湊健一郎，阿部千鶴，櫻井香子，田川裕士，鈴木勇治，タモギタケ、ナメコ中機能性多糖のサイトカイン産生作用の検討，日本農芸化学会2010年度大会，2010年3月，東京
- ② Minato K.，Abe C.，and Nakamura K.，

An immunomodulating action of a polysaccharide from an edible mushroom, *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*, EPNOE 2009, 2009年9月，フィンランド

- ③ 阿部千鶴，中村香寿実，湊健一郎，ナメコの免疫調節作用，日本農芸化学会 2009年度大会，2009年3月，福岡
- ④ Minato K., and Abe C., An immunomodulating action of a polysaccharide fraction from an edible mushroom, *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*., International Conference on Food Factors for Health Promotion 2007, 2007年12月，京都
- ⑤ 湊健一郎，阿部千鶴，タモギタケ中多糖の免疫調節作用に対するその他食品成分の影響，日本農芸化学会2008年度大会，2008年3月，名古屋

〔図書〕（計 1 件）

- ① K. Minato, "Mushrooms: Immunomodulative activity and role in health promotion" in *Dietary components and Immune Function.*, ed. R. R. Watson et al., Humana Press and Springer, 2010年6月

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.myu.ac.jp/kenkyu/h21kakenhi.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊健一郎 (MINATO KEN-ICHIRO)

宮城大学・食産業学部・講師

研究者番号：10341728

(2) 研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

()

研究者番号：