

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 2 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500945

研究課題名(和文)食品増粘素材多糖キサンタンガムの免疫調節機能

研究課題名(英文) Immunopotentiating activity of xanthan gum polysaccharide widely using as food thickening agent

研究代表者

岡崎 勝一郎 (OKAZAKI, Katsuichiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60109733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食品増粘素材として多用されている多糖であるキサンタンガムの新たな健康機能を明らかにして、食生活上の有益性を確立することを目的として、免疫細胞に与える影響をマウスのマクロファージ培養細胞と脾臓細胞を用いて検討した。その結果、細胞性免疫を増強させるサイトカインであるインターロイキン-12とインターフェロン- γ の産生誘導が乳酸菌と同様に認められたことから、細胞性免疫の賦活化作用といった乳酸菌と同様な健康機能効果があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Xanthan gum is a polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* and widely used as food thickening agent. We examined cytokine productions in mouse macrophage-like cell line (J774.1) and in mouse primary spleen cells by xanthan gum. The production of interleukin (IL)-12 in J774.1 cells was enhanced by xanthan gum. In primary spleen cells from C3H/HeN [sensitive to lipopolysaccharide (LPS)] mice, the productions of IL-12 and interferon- γ were enhanced by xanthan gum, LPS and heat-killed *Lactobacillus plantarum*. These results suggested that xanthan gum induces cell-mediated immune response promoted by T helper 1 type cells. Therefore, xanthan gum as well as lactic acid bacterium has also function to protect decrease of cellular immunity in aging.

研究分野：動物細胞工学

キーワード：食品 多糖 免疫機能 マクロファージ 細胞性免疫 乳酸菌

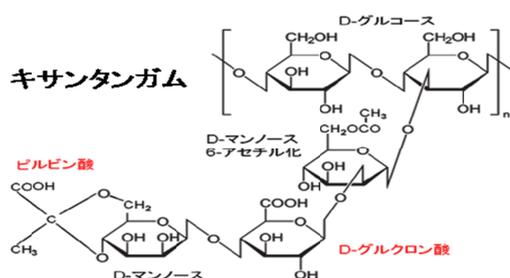
様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫系は、自然免疫系と獲得免疫系の2つに大別される。自然免疫系では好中球やマクロファージなどの食細胞とナチュラルキラー(NK)細胞が異物を排除する。獲得免疫系では、抗原と特異的に結合するアレルギーに関与するIgEなどの抗体をB細胞が産生する体液性免疫と抗原により活性化されたT細胞が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫がある。TあるいはB細胞活性化を補助するヘルパー(Th)T細胞には1型と2型があることが見つけられて以来、免疫力はTh1型(細胞性免疫)とTh2型(体液性免疫)細胞数のバランスの上に成り立っていると考えられている。全身の組織中にあるマクロファージや樹状細胞は免疫系の中心に位置して、トール様受容体(TLR)を介した外部からの刺激により活性化して免疫系を始動させる。

(2) 特定の乳酸菌には、マクロファージを活性化してサイトカインであるインターロイキン(IL)-12を産生し、ヘルパーT細胞のTh1型への分化増殖を促進することにより細胞性免疫を増強するとともに、Th1型細胞により生産されるインターフェロン(IFN- γ)がTh2型への分化増殖を抑制するのでアレルギー抑制効果がある。IL-12は自然免疫系のNK細胞も活性化するので、体内で絶えず発生する変異した異常な癌細胞等を監視し初期に排除できる。これまでキノコ由来の β -グルカンや海藻由来の硫酸多糖であるフコイダン等の多糖にも乳酸菌と同様な細胞性免疫を増強する免疫賦活化作用があることが知られている。

(3) キサンタンガムは、グラム陰性細菌である *Xanthomonas campestris* から生産される多糖で、少量の添加で低温でも高い粘性を発揮するので、佃煮、ドレッシング、たれ、ソースなどの食品、さらには、乳液や化粧水といった化粧品に粘度を付与する目的で多用されており、国内では年間1300トン以上使用されているが、増粘作用以外の機能は知られていない。本多糖の主鎖は、D-グルコースが β -1,4結合したセルロース骨格から成り、側鎖は主鎖のグルコース残基1つおきにD-マンノース2分子とグルクロン酸が結合している。末端にあるマンノースの4位と6位炭素にピルビン酸が結合している(下図)。



2. 研究の目的

食品増粘素材として多用されている多糖であるキサンタンガムの新たな健康機能を明らかにして、食生活上の有益性を確立することを目的として、免疫細胞に与える影響をマウスのマクロファージ培養細胞と脾臓細胞を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌由来のリポ多糖(LPS)と乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* L137)を陽性対照として使用した。

(2) マウスマクロファージ様細胞株(J774.1)を48プレートの各well (2.5×10^5 cells / 0.5 ml)に入れて37 $^{\circ}$ Cで培養(RPMI1640培地中)した。翌日キサンタンガム、LPSあるいは乳酸菌を所定濃度となるように調製した培養液(0.5 ml)と交換して、さらに1日培養後、培養上清中のIL-12を酵素免疫測定法で定量した。

(3) 8週齢マウスのC3H/HeN(リポ多糖LPSに対する応答性が高い)系とC3H/HeJ(LPSに対する応答性が低い)系から調製した脾臓細胞を24プレートの各well (2×10^7 cells / 0.5 ml)に入れた後、検定物質を含む培養液(0.5 ml)を添加して37 $^{\circ}$ Cで1日後に培養上清中のIL-12とIFN- γ を、あるいは3日後に培養上清中のIL-4、IL-17、IL-6と腫瘍壊死因子(TNF- α)を酵素免疫測定法で定量した。

(4)キサンタンガムを2Mトリフルオロ酢酸の存在下100 $^{\circ}$ Cで6時間部分加水分解を行い、分解産物であるオリゴ糖をパラアミノベンジルエチルエステルで蛍光標識して、高速液体クロマトグラフィーにより分析した。

4. 研究成果

(1) マウスマクロファージ様培養細胞株でのIL-12の産生誘導: J774.1細胞はマウスマクロファージ様培養細胞株で免疫賦活化作用のある物質の検定に広く用いられている。キサンタンガムは、J774.1細胞において、濃度依存的にIL-12の産生を誘導した(図1)。

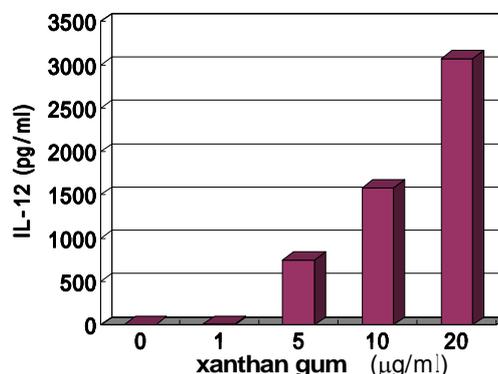


図1. J774.1細胞でのキサンタンガムによるIL-12の産生誘導

(2) C3H/HeN と C3H/HeJ 系マウス脾臓細胞での IL-12 と IFN- γ の産生誘導 : LPS に対する応答性が高い C3H/HeN 系と LPS に対する応答性が低い C3H/HeJ 系から調製した脾臓細胞におけるキサンタンガム (50 μ g/ml) による IL-12 と IFN- γ の産生増強を酵素免疫測定法で定量した (図 2 と 3)。C3H/HeN 系統のマウス脾臓細胞ではキサンタンガム、LPS (0.1 μ g/ml) による IL-12 と IFN- γ の産生増強が認められた (図 2)。C3H/HeJ 系統のマウス脾臓細胞ではキサンタンガムと LPS による IL-12 の産生増強は認められたが、IFN- γ の産生増強は認められなかった (図 2)。したがって、は TLR-4 を介してマクロファージを刺激することが知られている LPS と同様にキサンタンガムによる IL-12 の産生増強による Th1 型細胞の IFN- γ 産生誘導を明確にすることができた。また、TLR-2 を介してマクロファージを刺激することが知られている乳酸菌 (10 μ g/ml) は、両系統の脾臓細胞で IL-12 と IFN- γ の産生をともに増強したが、その産生は C3H/HeJ 系統では C3H/HeN 系統より低下していた (図 2 と 3)。

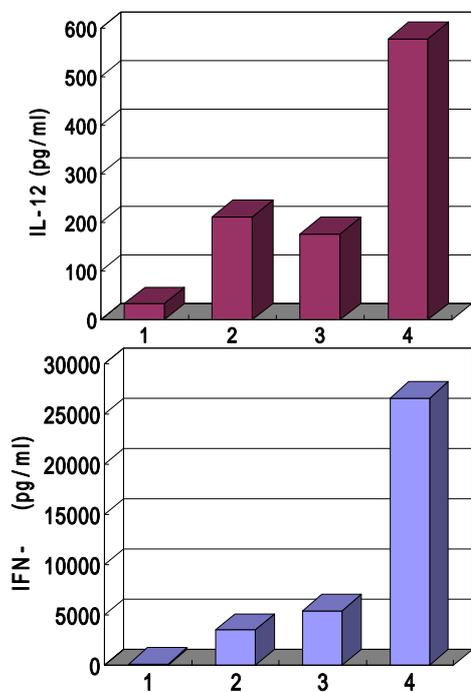


図 2. C3H/HeN 系マウス脾臓細胞での LPS、キサンタンガムと乳酸菌による IL-12 (上図) と IFN- γ (下図) の産生誘導. 1: 無処理, 2: LPS (0.1 μ g/ml), 3: キサンタンガム (50 μ g/ml), 4: 乳酸菌 (10 μ g/ml)

(3) マクロファージ様培養細胞での IL-12 の産生誘導における LPS との相互作用 : マクロファージ細胞表面の TLR-4 を介する LPS と TLR-2 を介する乳酸菌は刺激する受容体が異なるので IL-12 の産生増強は相乗的な誘導効果が予想される。キサンタンガムが刺激する受容体を推定するため LPS との相互作用を検討した (図 4)。その結果、LPS (0.1 μ g/ml) で刺激したマクロファージ様細胞にキサン

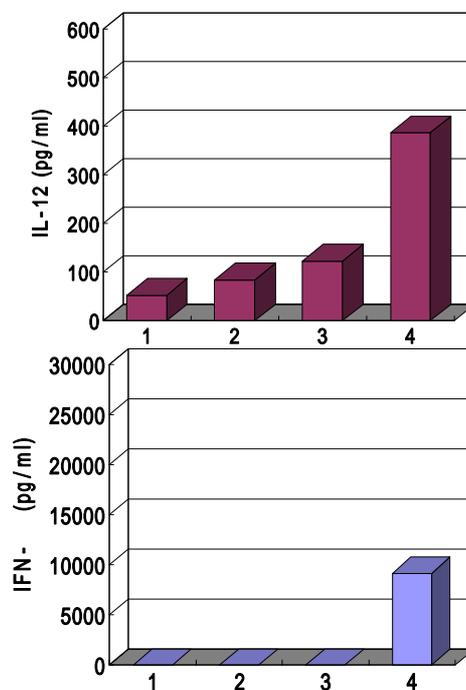


図 3. C3H/HeJ 系マウス脾臓細胞での LPS、キサンタンガムと乳酸菌による IL-12 (上図) と IFN- γ (下図) の産生誘導. 1: 無処理, 2: LPS (0.1 μ g/ml), 3: キサンタンガム (50 μ g/ml), 4: 乳酸菌 (10 μ g/ml)

タンガムあるいは乳酸菌死菌体 (10 μ g/ml) を加えると、IL-12 産生の相乗効果が乳酸菌には認められたが、キサンタンガムには認められなかった。したがって、キサンタンガムは LPS と同様にマクロファージ上の TLR-4 を通して免疫系を賦活化していることが示唆された。

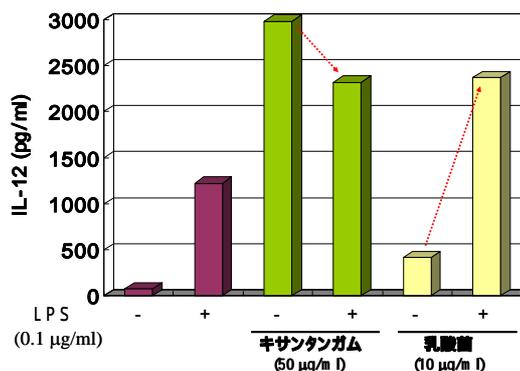


図 4. マクロファージ様培養細胞での IL-12 の産生誘導における LPS との相互作用

(4) アレルギー抑制効果 : キサンタンガム、乳酸菌菌体と LPS によるマウス脾臓細胞での各種サイトカインの産生を検討した。マウス C3H/HeN 系の脾臓細胞にキサンタンガム (50 μ g/ml)、乳酸菌 (10 μ g/ml) あるいは LPS (0.1 μ g/ml) を添加して、培養 3 日後の培養上清中の、体液性免疫の指標である IL-4、ヘルパー T 細胞 17 型が産生する IL-17 とその産生細

胞を分化・誘導するマクロファージが産生する IL-6、さらに、好中球の浸潤を誘導して細菌の貪食に関与するマクロファージが産生する TNF- α を酵素免疫測定法で定量した。その結果、検討したキサンタンガム、乳酸菌と LPS はすべて IL-6 と TNF- α の産生を増強した。IL-4 産生に対しては、キサンタンガム、乳酸菌と LPS は抑制効果が認められた。また、IL-17 産生に対しては、キサンタンガムと乳酸菌は産生増強効果を示したが、LPS は産生を抑制した。IL-4 の産生低下はヘルパー T 細胞 1 型と 2 型の免疫バランスを 1 型つまり細胞性免疫の増強へと向かわせるので、相対的にアレルギーが抑制される。また、IL-17 は、いくつかの自己免疫疾患の発症にも関与するが、健康な状態では好中球の浸潤を誘導し、炎症反応を起こさせ細菌に対する防御反応を行う。したがって、キサンタンガムは乳酸菌と同様にアレルギー抑制効果と好中球による細菌に対する防御という免疫機能性があると考えられた。

(5)キサンタンガムの糖鎖分析とその応用：糖鎖を高速液体クロマトグラフィーで解析した結果、部分加水分解産物として、セロビオース、グルコース、マンノースが検出された(図 5)。キサンタンガムが含まれている美容液を透析し低分子物を除いた内液のエタノール沈殿物の部分加水分産物をこの方法で分析した結果、キサンタンガム由来の糖のピークが検出された。また、キサンタンガムの部分加水分解産物を美容液試料に添加するとピークの増加が確認できた。さらに、セロビオースピークから、美容液中のキサンタンガムの定量も可能であった。したがって、高速液体クロマトグラフィー分析によって食品や化粧品中のキサンタンガムの検出と定量が可能であると考えられた。

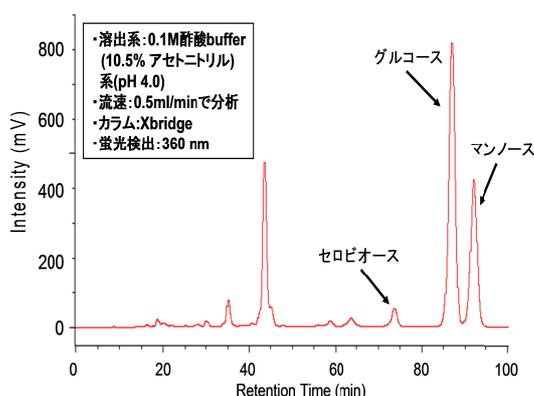


図 5. キサンタンガム部分加水分産物の高速液体クロマトグラフィー分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shimada, M., Kadowaki, T., Taniguchi, Y., Inagawa, H., Okazaki, K. and Soma, G.: The involvement of O-antigen poly-

saccharide in lipopolysaccharide in macrophage activation. Anticancer Research, 32, 2337-2342 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Okazaki, K. and Okutani, K.: Inhibitory mechanism of melanin biosynthesis by marine bacterial glycosaminoglycan. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology (第 9 回アジア - 太平洋マリンバイオテクノロジー会議), 高知 (2012.7.13-16). カルポート高知、高知市

岡崎勝一郎：海洋細菌多糖と希少糖の機能性及びそれらを利用した食品等の開発、岡山県食品新技術応用研究会 第 288 回研修会 (2012. 9.25). 場所：テクノサポート岡山、岡山市

岡崎勝一郎：海苔多糖ポルフィランの免疫賦活化作用と腸管保護作用、平成 24 年度かがわ糖質バイオフォーラム複合糖質・糖鎖研究会、サンポートホール高松 (2013.1.7). 高松市

岡崎勝一郎：海洋細菌多糖ウミノグリカンと食品増粘多糖キサンタンガムの免疫賦活化作用と美白作用、平成 25 年度かがわ糖質バイオフォーラム複合糖質・糖鎖研究会、サンポートホール高松 (2014.1.15) 高松市

岡崎勝一郎, 矢守隆夫, 奥谷康一：がん抑制機能を有する海洋微生物多糖の免疫賦活化作用、第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会 三重大学 (2014.5.31-6.1) 三重県 津市。

岡崎勝一郎, 遠藤有希子, 村川春菜, 若松久人, 奥谷康一：微生物多糖キサンタンガムの免疫賦活化作用と美白作用第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会東京海洋大学 (2015.5.30-31) 東京都品川区

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：皮膚の光老化抑制剤

発明者：岡崎勝一郎、蓮井昌彦、奥谷康一

権利者：香川大学、シーバイオン

種類：特許

番号：特許願 2013-34628 号

出願年月日：平成 25 年 2 月 25 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡崎勝一郎 (OKAZAKI Katsuichiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60109733