

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：33919

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650465

研究課題名（和文） テクスチャーの違いは機能性多糖の免疫調節作用を増強するか

研究課題名（英文） Immunomodulating action of a polysaccharide from *Pholita nameko*, and its influence for texture in functional food

研究代表者

湊 健一郎 (MINATO KEN-ICHIRO)

名城大学 農学部・准教授

研究者番号：10341728

研究成果の概要（和文）：本実験では、ナメコの分泌抽出物（粘性ゲル状食品）およびナメコ子実体（固形状一般食品）由来多糖の免疫調節作用について、リンパ球およびマクロファージに対する活性化および分化への影響、つまり免疫調節作用を重点的に調べた。ヘルパーT細胞における Th1/Th2 バランスに対する食用キノコの影響は、これまでも多くの報告がある。本実験でもナメコ試料が、生体に対して Th1 優位に影響することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

An edible mushroom, *Pholiota nameko*, has possessed a functional polysaccharide fraction. This polysaccharide fraction stimulated murine and human macrophages, and then induced to produce TNF- α and nitric oxide. Furthermore, to investigate whether this polysaccharide could act as an immunomodulator in *P. nameko* fruiting body, we determined a pattern of cytokine production in peritoneal macrophages from BALB/c mice administered the freeze dried powder of the mushroom. It showed to enhance immunomodulating effects on the production of TNF- α from peritoneal exudates macrophages. Moreover, *P. nameko* fruiting body significantly increased CD3⁺CD4⁺ T cells subset in spleen from the mice. Polarized macrophages are broadly classified into two types, that is, M1 type and M2 type. Like the Th1 and Th2, M1 are proinflammatory effectors and express mediators of inflammation such as IL-12. On the other hand, M2 secretes IL-10. *P. nameko* treatment showed to more increase IL-12 inside of treated monocyte. These results suggested that a polysaccharide from *P. nameko* activated immunocompetent cells, and could provide source materials for the development of a Th1-polarizing immunomodulator. Thus, this mushroom also could be expected to use as an effective material of a functional food and an immunomodulator.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

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：機能性多糖，食用キノコ，免疫調節作用，Th細胞，マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで科学研究費補助金等により、

食品因子の一つである機能性多糖の免疫調節作用について、他の成分との相互作用も視野に

入れて調査している。食品の摂取には、「咀嚼」という行為が必要である。この咀嚼と我々の生体内における様々な生理機能との間には、関連性がある可能性が指摘されている。例えば、「よく噛む」ことは生体調節機能を維持できる、といった知見である。そこで本研究では咀嚼に大きく影響を及ぼす食品の「物性(テクスチャー)」について、機能性多糖の生体内免疫系に対する影響を解析して、食品機能において物性と機能性の関連性を解明することを目的とする。食用キノコ中には多種類の多糖類が含まれており、それらの中には、免疫調節作用を持つ機能性多糖として疾病の治療・予防効果を持つものも多い。しかしながら、その物性や食品としての形態の違いによる機能性の違いについて報告は非常に少ない。そこでナメコ中機能性多糖に着目して、それが含まれる食品形態の違いによる免疫調節作用を調べることを企画した。

これまでに代表者はすでに、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を示している(図 1)。そこで本実験では、それらの成果踏まえて、ナメコ中機能性多糖の免疫調節作用機構の解明を試みると同時に、ナメコ試料が食品の物性に与える影響を調査した。

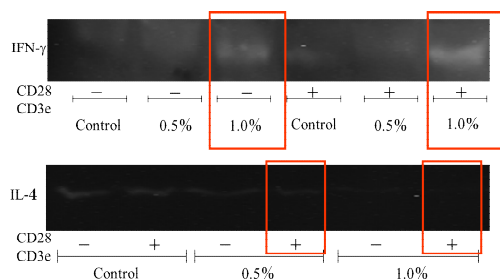


図 1 ナメコ摂食による BALB/c マウス脾リンパ球におけるサイトカイン産生に対する影響

2. 研究の目的

食事において咀嚼という動作は食品を細かくするためだけでなく、消化機能の向上、歯周疾患の予防等の健康維持効果を持っている。更に咀嚼の際の噛みごたえは食品のおいしさの要因とされており、食品のテクスチャーをコントロールすることはこの点で重要とされている。多糖類は寒天やゼラチンから作られるゲル状食品における増粘安定剤として広く用いられている。

本実験では、以下の項目にしたがって、ナメコ抽出物及び子実体についてマクロファージの活性化を指標に、食品の形態(液状か、固体状か)の違いによって、免疫調節作用が変化するか調べた。また、機能性食材の開発を見据えて、ナメコ由来の機能性多糖が従来の増粘安定剤の代わりとして利用できるかどうか、それら機能性多糖自体が食品形態にどのような影響を与えるかを、ゲル物性に与える影響を指標に調査した。

(1) ナメコ中機能性多糖の免疫調節作用

(2) ナメコ抽出物および子実体の免疫調節作用の違い

さらにこれらの結果を踏まえたうえで、機能性食品開発を見据えて、

(3) ナメコ中機能性多糖の食品物性に与える影響を調査した。

3. 研究の方法

(1) ナメコ中機能性多糖の免疫調節作用

本研究ではナメコから熱水により抽出した後、等量のエタノールを加えて得られた沈殿画分を多糖画分として用いた。

免疫担当細胞であるマクロファージをターゲットに、培養細胞株であるTHP-1 細胞株を用いて、それらに対して本画分を添加して、サイトカイン産生能を指標にして、免疫調節作用を調査した。

(2) ナメコ抽出物および子実体の免疫調節作用の違い

食用キノコにおいて、抽出物中と子実体中の機能性多糖は、本体は同じであるが食品として摂取する場合には、その形態が大きく異なってくる。キノコ類は本来子実体の形状を維持したまま、食用として利用される。そこで本実験では、実験動物に対してナメコ子実体をそのまま固形食品として与えた際の、機能性多糖の免疫調節作用について調査した。

本実験においてBALB/c マウスを用いて、2週間各試料を摂取させた後、腹腔マクロファージのサイトカイン産生能をウェスタンブロット法により調べた。

(3) ナメコ中機能性多糖の食品物性に与える影響

多糖類は食品における増粘安定剤として、広く用いられている。本実験では、寒天ゼリーを基本食品として、それにナメコ分泌物もしくは子実体熱水抽出物を添加して、破断強度をレオメーター(山電 RE-3305)により測定した。寒天 0.01g/mL に各種多糖類(可溶性でんぷん、ペクチン、ラミナリン、ナメコ分泌物、およびナメコ子実体熱水抽出物)0.001gもしくは0.01gを添加したゼリーを調製した。レオメーターで破断強度測定試験をおこない、それらのテクスチャーを評価した。試料ゼリーのサイズは1cm³立方体とし、圧縮長6.0mm、圧縮速度0.5mm/sec、プランジャーは直径

3cm の円形プランジャーを用いた。

4. 研究成果

(1) ナメコ中機能性多糖の免疫調節作用

得られた多糖画分は免疫担当細胞であるマクロファージを刺激し、TNF- α および NO (Nitric oxide)の産生を誘導した(図2)。つまり、ナメコ中の機能性多糖はマクロファージを、炎症反応を介した活性化へと誘導することが示唆された。次にこの作用が、食品形態が異なると変化するのかどうか調べた。

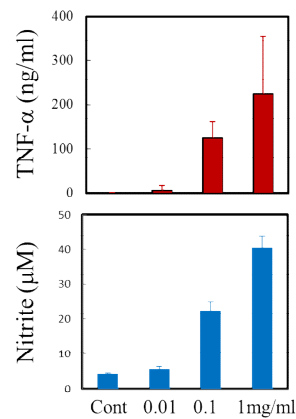


図2 ナメコ由来多糖画分のマクロファージ細胞株 THP-1 に対する免疫調節作用

(2) ナメコ抽出物および子実体の免疫調節作用の違い

図3に、ナメコ子実体をBALB/cマウスに一定期間摂食させた際の、免疫調節作用を調べるため、腹腔よりマクロファージを採取して培養した後、それらが分泌するTNF- α 量を、ウェスタンブロット法により測定した。その結果、Th1優位となる生体内変化が起こることが示された。

本実験ではさらに、この炎症反応を単球系細胞 THP-1 を用いたマクロファージ細胞分化能に対するナメコ抽出物(多糖画分)の作用を指標にして調査した。その結果、IL-12

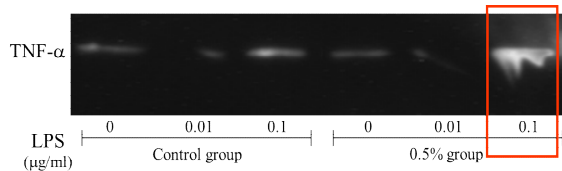


図 3 マウスBALB/cにおける、腹腔マクロファージのサイトカイン産生能に対するナメコ子実体摂取の影響

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(図 4)。古典的活化マクロファージへの分化は、前述のTh1分化に対応する。つまり、この結果からも機能性多糖は、食品形態の違いに左右されずに、その免疫調節作用を発揮するということが示唆された。

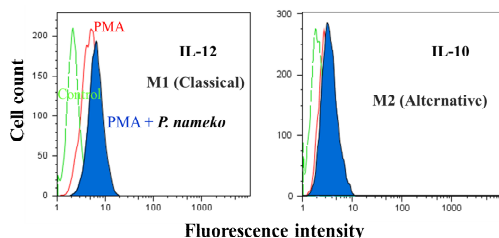


図 4 単球 THP-1 のマクロファージ分化に対するナメコ子実体由来多糖画分の影響

(3)ナメコ中機能性多糖の食品物性に与える影響

本実験では、なメコ由来多糖画分を、従来の安定剤の代わりとして利用することを目的とし、食品のゲル物性に与える影響も調査した。これは本研究の重要な目標でもある、市場への供給に耐えうる食品開発を見据えてのことである。

本実験において、各種多糖類を加えた結果、可溶性でんぷん及びペクチン・炭酸カルシウムを加えたものは濃度が上がると共に破断強度

が低下した。また可溶性でんぷん 0.01g ではゲルを形成することが出来なかった。ラミナリンは濃度に関わらず影響を与えなかった。ナメコ分泌物およびナメコ子実体熱水抽出物は、添加濃度が上がると共に破断強度を増加させることが分かった(未掲載)。これらの結果、ナメコ中機能性多糖を添加した試料は、どちらもラミナリンとは異なる影響を及ぼすことが示された。

以上の結果から、機能性多糖の添加により破断強度を増強させた「噛む」食品を作製することができた。そのため、噛むことの効果と機能性多糖の生理活性との、相乗作用を見据えた機能性食品の開発が期待できる。しかしながらこの結果は、本実験の本来の目的であった、「咀嚼・嚥下困難者用機能性食品の開発」においては、大いに課題を残すところとなった。

本実験では、特にわが国で人気がある食用キノコ、ナメコについて、その分泌抽出物(粘性ゲル状食品)およびナメコ子実体(固形状一般食品)由来多糖の免疫調節作用について、リンパ球およびマクロファージに対する活性化および分化への影響、つまり免疫調節作用を重点的に調べた。本実験では他に、ナメコ摂取マウスの脾リンパ球のT細胞サブユニットについて、FACSにより分析した(図 5)。その結果、ヘルパーT細胞に対する増強作用が認められた。

一方マクロファージは単球から分化するが、様々な分化型を示し、免疫

系の初期段階において重要な役割を果たすことが、最近明らかになりつつある。

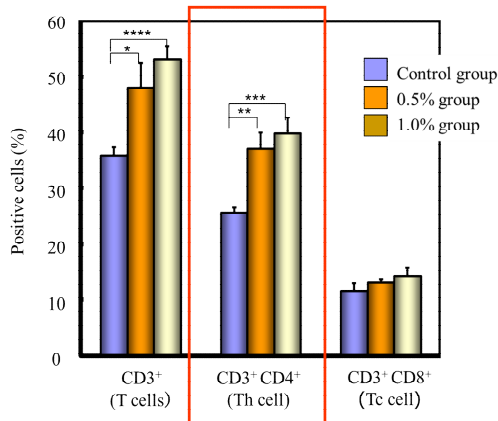


図5 BALB/cにおける、脾リンパ球サブセット分布に対するナメコ実体摂食の影響

生体内免疫系が Th1 優位に傾くということは、炎症反応が誘導されるということである。炎症反応は慢性化すると、炎症性疾患の発症につながるの、健康維持という点では好ましくない。そこで、ナメコ摂食マウスの脾リンパ球を回収後培養中に、どのようなサイトカインが産生されるか調査した。その結果、刺激を受けないリンパ球では、何ら変化がおこらなかった。このことは機能性多糖は、むやみやたらに生体に炎症反応を起こすということではなく、炎症反応という免疫系の活性化に対する潜在能力を高めるということにつながる。つまり、「健康なからだをつくる」手助けをしているということである。

《まとめ》

本実験で供したナメコ試料はその形状に関わらず、ともに炎症型と呼ばれる古典的活性型のマクロファージ(M1)へ分化を誘導して、そのため Th バランスが潜在的に 1 型優位に

なることを示唆した(図6)。また、機能性多糖を取り巻く環境(食品の形態)が異なっても、その作用自体は変化しないということも示唆された。これらのことは、これら機能性多糖を素材として様々な加工食品が開発できる可能性を示した有用な結果であると言える。しかしながら、咀嚼・嚥下困難者用食品としての開発には、新たな課題が判明した。今後は、いかに「食べやすい」食品にするか、添加量の調節や、どれくらいの期間食べ続ける必要があるのかなどを、明らかにする必要がある。

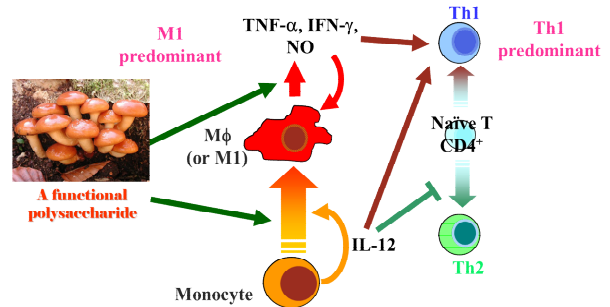


図6 ナメコを始めとする食用キノコ中多糖の免疫調節作用

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 1 件)

湊健一郎, 食用キノコ中機能性多糖の免疫調節作用と食品の物性に与える影響,

名城大学 名城大学総合研究所 H24 紀要 (印刷中), 査読無

[学会発表](計 3 件)

① Minato, K., Ohara, A., et al., An immunomodulating action, in macrophages, of a functional polysaccharide from an edible mushroom, Drug Discovery & Therapy World

Congress 2013, 2013年06月03日~06月06日
(ボストン)

② 安藤恵, 渡辺広大, 湊 健一郎, 小原章裕,
単球THP-1における微量栄養素の分化への影
響, 第67回日本栄養・食糧学会大会, 2013年05
月26日

③ Minato, K., Ohara, A., et al., An
inflammatory and anti inflammatory action of
Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus
against macrophages, The 3rd Conference
for the African Society for Edible and
Medicinal Mushrooms (ASEMM), 2012年06
月24日~28日(ナミビア)

[図書](計 1件)
Minato, K. and Abe, C., Immunomodulating
effect of polysaccharide,
Bioactive Food as Interventions for Arthritis
and Related Inflammatory Diseases,
pp241-250, 2013

[産業財産権]
○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

[http://www-agr.meijo-u.ac.jp/cgi-bin/la
bo10/index.html](http://www-agr.meijo-u.ac.jp/cgi-bin/la
bo10/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
湊 健一郎 (MINATO KEN-ICHIRO)
名城大学・農学部・准教授
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: