

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：34421

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350159

研究課題名(和文)担子菌類に含まれる脂質成分の腸管における免疫活性化およびアレルギー改善効果

研究課題名(英文) Intestinal immunomodulatory and anti-allergic activities of the lipids components in edible basidiomycete fruit body.

研究代表者

庄條 愛子 (Shojo, Aiko)

相愛大学・人間発達学部・准教授

研究者番号：40517265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高速液体クロマトグラフィーを用いた総脂質からの各種脂肪類の分離と定量、分布の評価から、食用担子菌類子実体の総脂質は糖セラミドの種類、含有量に大きな差があること、中性脂質や極性の高い複合脂質の種類、含有量に大きな差があること、キノコの種類により複合脂質の種類は大きく異なり、非常に多種であることが明らかとなった。また、キノコ脂質成分の腸管免疫賦活作用は、腸管でのパイエル板B細胞のIL-4によるクラススイッチ(IgA+B細胞への変化)、IL-6によるIgA+B細胞からのIgA産生促進、IgA+B細胞からのIL-10産生とINF-の抑制によるものと推察された。

研究成果の概要(英文)：From the data of high-performance liquid chromatography analysis, following results had been demonstrated. The glucosylceramide of edible basidiomycete fruiting bodies had a large difference in that varieties and contained amount. The Differences with the contained amount of neutral lipids and the polarity of complex lipids demonstrated. When the peyer's patch were co-cultured with total lipid of edible basidiomycete fruiting bodies, the cytokines as IL-4, IL-6 and IL-10 were increased. The increased these cytokines in response to total lipids of edible basidiomycete fruiting bodies in the diet compared with a control diet. From these results suggest that the B cell has class-switched to IgA+B cell by the response to IL-4, these class-switched IgA+B cell increased IgA production in response to IL-6.

研究分野：食品の三次機能研究としての食用担子菌類をはじめとする食品に含まれる多糖・糖脂質の免疫賦活作用の評価

キーワード：食用担子菌類 腸管免疫 腸内細菌 IgA パイエル板

1. 研究開始当初の背景

(1) 食用担子菌類とその機能性成分、食品中の多糖と腸管免疫活性化作用

担子菌 *Basidiomycota* の子実体であるキノコは、古くから食用として馴染み深く、アガリクス、ハナビラタケなどは健康食品としても広く販売・消費されている。その機能性について多くの研究が行われ、特にハナビラタケ *Sparassis crispa* においては、血糖値低下作用、マスト細胞を介したアレルギー性炎症の抑制による抗アレルギー作用やヒト NK 細胞の増加と活性化、糖尿病ラットでの損傷治癒促進作用等、近年に至るまで多数の報告がなされている。これらの報告において、多様なハナビラタケの生理作用の多くは高濃度に含まれる β -グルカンによると考察されている。キノコに含まれる β -グルカンについては、シイタケに含まれるレンチナン、スエヒロタケに含まれるソニフィランおよびカワラタケに含まれるクレスチンなどが広く研究され医薬品としても認可されており、キノコにおける含有量が最も高いことから、生理活性の主成分であると認識されている。一方で、ハナビラタケの β -グルカンを含まない低分子画分(分子量 8,000 以下)をマウスに経口摂取させた場合には、担癌動物での癌細胞増殖抑制効果が確認されていることから、 β -グルカン以外の微量成分が免疫応答に関与している可能性が示唆され。

(2) 研究開始当初までの研究代表者の研究経歴と研究の実施環境

研究代表者は研究開始当初まで、小腸パイエル板培養細胞およびマウスを用いてビフィズス菌および乳酸菌産生多糖や昆布由来多糖の腸管免疫活性化作用とアレルギー抑制効果および炎症抑制効果について研究を行い、ビフィズス菌産生多糖の腸管免疫を介した免疫調節作用と損傷治癒促進効果を明らかにしている(「抗アレルギー剤」特願 2010-67639 河野麻実子、北村進一、庄條愛子)。さらに、廃棄物処理されている柿とハナビラタケ子実体および廃菌床の有効利用を目的として、ハナビラタケに含まれる各種成分とその *in vivo* における免疫賦活作用の評価を行った(JST A-STEP、FS ステージ、探索タイプ未利用の柿及び茸廃菌床を活用した機能性家畜飼料の開発および製品化、H24~H25 年)。

研究代表者が研究開始前年に着任した相愛大学では、研究分担者である水野浄子教授が種々の食用担子菌類における GSL の分布と構造について検討を行い、マイタケ、エノキタケの GSL の詳細な構造を明らかにしている(2011 年基盤(C)課題番号 23500980)。

(3) 本研究課題の研究開始当初の学術的背景
上記の(1)および(2)から、食用キノコ子実体に含まれる脂質成分の解明と *in vitro* および *in vivo* での免疫調節における作用機序に

ついて検討を行い、キノコの機能性を脂質生化学的・脂質免疫学的側面から評価し、体調節機能である三次機能を解明する本研究課題の着想に至った。

(4) 研究開始当初までの研究成果

研究代表者は、研究開始当初までにハナビラタケ子実体、総脂質および GSL を含むアルカリ安定化脂質のマウスへの投与試験を実施し、腸管免疫賦活作用と全身性の免疫活性化に及ぼす影響を検討した。その結果からハナビラタケの β -グルカンを含まない脂質成分にも腸管免疫賦活作用があること、全身性の免疫は脂質により最も賦活化されることが明らかとなったが、腸管免疫の指標である糞 IgA 濃度と血中の IFN- γ 濃度には多糖の投与時に認められるような正の相関は認められないことが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究課題は、食用担子菌類由来の糖脂質と微生物や海藻由来の多糖の免疫賦活作用機序の違い、食用担子菌類の脂質成分の腸管免疫賦活作用と全身性の免疫賦活作用、食用担子菌類の種類による脂質成分の違いが免疫調節に及ぼす影響を明確にすることを目的として、実験を計画した。

食用担子菌類の食品としての三次機能は広く知られているものの、成分との関連性についての詳細な検討は非常に限定的であり、多糖以外の成分についての報告は少ない。そのため本研究課題では、市販されている食用担子菌類の成分と三次機能の関連性について検討することも重点的な目的として、研究計画を行った。

3. 研究の方法

(1) 各種キノコに含まれる脂質成分の抽出と単離精製

市場で販売されている各種食用担子菌(食用キノコ: エノキタケ、マイタケ、エリンギ、シメジ)子実体から脂質成分を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開し、各種脂質成分を単離精製した。

(2) 総脂質からの各種脂肪類の分離と定量、分布および脂肪酸組成の解析

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、各種食用担子菌(食用キノコ: エノキタケ、エリンギ、シイタケ、ハナビラタケ)総脂質成分中の各種脂肪類の分離と定量および脂肪酸組成の解析を検討した。

(3) キノコ脂質成分の腸管免疫賦活作用の評価

In vitro での腸管免疫賦活作用の評価は、マウスの小腸パイエル板から分離した細胞を各種キノコ総脂質および脂質成分添加培地で培養し、培地中に放出される各種サイトカイン(IFN- γ 、IgA 等)濃度の測定により実施

した。In vivo での腸管免疫賦活作用の評価は、食用担子菌子実体(ハナビラタケ)、総脂質および脂質成分のマウスへの投与試験により実施し、マウス血液中の各種サイトカイン濃度、糞 IgA 濃度の測定、形態学的評価としてパイエル板組織の面積を測定した。

4. 研究成果

(1) 各種キノコに含まれる脂質成分の抽出と単離精製

本研究課題以前に研究代表者が食用担子菌類から総脂質を抽出する際には、食用担子菌類子実体の凍結乾燥、Folch 法による小バッチでの調整(食用担子菌類子実体粉末 2g からの抽出)を実施していた。この調整方法では、抽出におけるロスや抽出ロットごとの成分の差異が大きいこと、脂質の調整に時間がかかることから、大量脂質抽出法を検討した。小バッチ抽出法を基準にして抽出溶媒量、抽出時間を種々組み合わせシイタケ、エリンギ、ハナビラタケなどの食用担子菌類子実体の脂質抽出を行った。

ラージスケール(食用担子菌類子実体 乾燥粉末 30g)の脂質抽出の際には、食用担子菌類子実体を低温(30℃以下)で風乾したのもでも、子実体凍結乾燥粉末とほぼ同じ量の総脂質が得られた。また、ラージスケール抽出では、乾燥子実体を抽出溶媒(クロロホルム：メタノール)に長時間(12~24 時間)浸漬することで、小バッチ抽出法とほぼ同じ量の総脂質を得ることができた。さらに、低温風乾子実体法、抽出溶媒への長時間の浸漬によるラージスケール抽出で得られた総脂質の TLC パターンは、いずれも小バッチのものと同様であった。

(2) 総脂質からの各種脂肪類の分離と定量、分布および脂肪酸組成の解析

本研究課題では、市場流通量の多い食用担子菌類子実体の成分と三次機能の関連性について検討することも目的としていることから、シイタケ、エリンギ、ハナビラタケなどの高速液体クロマトグラフィー分析(HPLC)を用いた複合脂質の分離技術の確立と評価を実施した。

PVA 表面修飾シリカゲルカラムを用いた HPLC 分析の結果から、これらのキノコには糖セラミド(図 1 実線囲み部分)だけでなく、非常に極性の高い、多種の複合脂質が高濃度に含まれることが明らかとなった(図 1 点線囲み部分)。

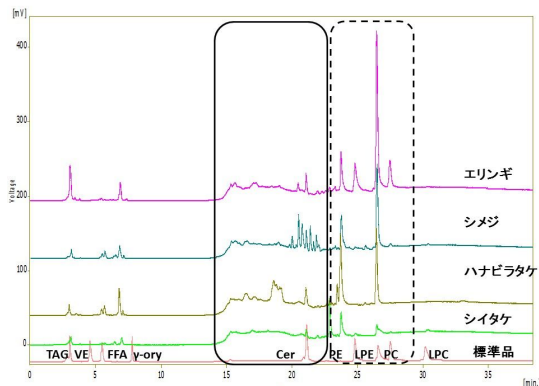


図 1. エリンギ、シメジ、ハナビラタケ、シイタケ子実体総脂質の HPLC 分析の結果

(3) キノコ脂質成分の腸管免疫賦活作用の評価

本研究課題ではキノコ脂質成分の in vitro での腸管免疫賦活作用の評価法として、マウスの小腸パイエル板から分離した細胞との共培養試験を実施した。本実験方法は、多糖の腸管免疫賦活作用の評価に汎用されるものであるが、脂質での報告は少ないことから、共培養時のサンプル濃度などの検討を行った。培地への分散性、細胞毒性などを検討した結果、ケフィランなどの多糖の評価系でのサンプル濃度(2~200 μg/ml)に調整したハナビラタケ子実体総脂質の in vivo での腸管免疫賦活作用を検討した。

ハナビラタケ子実体 200 μg/ml 投与区では、共培養(5 日間)後のパイエル板培養上清中の IL-4、6 および 10 の増加が観察された。この結果から、ハナビラタケ子実体総脂質は腸管免疫賦活作用を有すること、その免疫賦活作用は IL-4 によるパイエル板培養細胞に含まれる B 細胞の IgA⁺B 細胞へのクラススイッチ、IL-6 による IgA⁺B 細胞からの IgA 産生促進によると考察された(図 2)。

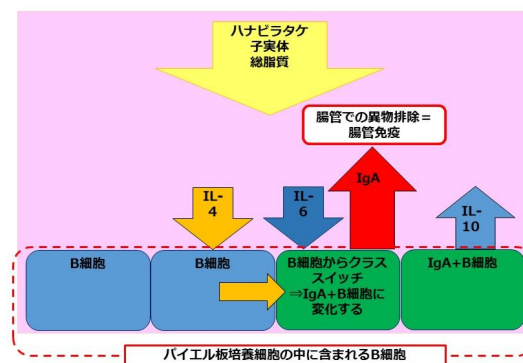
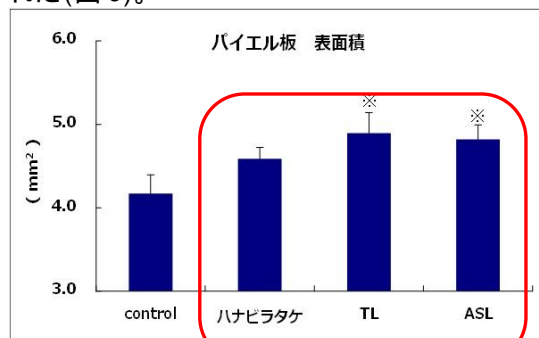


図 2. パイエル板培養細胞でのハナビラタケ子実体総脂質による腸管免疫賦活化モデル

本研究課題では in vivo での腸管免疫賦活作用の評価として、食用担子菌類子実体(ハナビラタケ)、総脂質および脂質成分のマウスへの投与試験を実施し、マウス血液中の各種サイトカイン濃度、糞 IgA 濃度の測定、形態

学的検討としてパイエル板組織の大きさを測定した。

ハナピラタケ子実体(2g/kg 体重/日)、総脂質および糖脂質(アルカリ安定化脂質)を投与したマウスでは、対照区に比べて糞 IgA 濃度の有意な増加が観察された。また、ハナピラタケ子実体総脂質、糖脂質では対照区に比べてパイエル板表面積の有意な増加が観察された(図 3)。



: 対照区との間に有意差あり(P<0.05)

図 3. ハナピラタケ子実体、総脂質(TL)および糖脂質(ASL)投与マウスのパイエル板表面積

In vitro および In vivo の腸管免疫賦活作用の評価から食用担子菌類子実体および脂質成分の免疫賦活作用は、腸管でのパイエル板 B 細胞の IL-4 による IgA⁺B 細胞へのクラススイッチ(IgA⁺B 細胞への変化)、IL-6 による IgA⁺B 細胞からの IgA 産生促進、IgA⁺B 細胞からの IL-10 産生と INF- γ の抑制によるものと推察される。

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)

(1) 庄條 愛子、古郷 加奈、山本(合田)麗奈、小林 貴美子、中 崇、藤原 永年、北村 進一、水野 淨子、ハナピラタケ子実体および脂質成分の免疫賦活作用、相愛大学研究論集、査読あり、30 巻 : 15-20(2014)
https://soai.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=1474&item_no=1&page_id=13&block_id=17

(2) 庄條 愛子、古郷 加奈、山本(合田)麗奈、小林 貴美子、中 崇、藤原 永年、北村 進一、水野 淨子、ハナピラタケ子実体および脂質成分の腸内菌叢への影響、相愛大学研究論集、査読あり、31 巻 : 1-5(2015)
https://soai.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=1585&item_no=1&page_id=13&block_id=17

[学会発表](計 2 件)

(1) 今井 ももこ、庄條 愛子、庄條 昌之、乾 博、水野 淨子、北村 進一、ハナピラタケ子

実体および脂質成分の免疫賦活作用、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

(2) 庄條 愛子、庄條 昌之、今井 ももこ、水野 淨子、乾 博、北村 進一、食用担子菌類、ハナピラタケ子実体および脂質成分の腸内菌叢への影響、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄條 愛子 (Shojo Aiko)

相愛大学・人間発達学部・准教授

研究者番号 : 40517265

(2) 研究分担者

北村 進一 (Kitamura Shinichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 60117869

藤原 永年 (Fujiwara Nagatoshi)

帝塚山大学・現代生活学部食物栄養学科・教授

研究者番号 : 80326256

水野 淨子 (Mizuno Seiko)

相愛大学・人間発達学部・教授

研究者番号 : 90190652