Research and Development of β -1,3-1,6-Glucan from Black Yeast for a Functional Food Ingredient*

機能性食品素材に向けた黒酵母由来高純度 β -1,3-1,6-グルカンの開発*

(2011年11月30日受付)

鈴木利雄^{1,**}, 西川孝治¹, 中村誠司¹, 鈴木隆浩²

(すずき としお, にしかわ こうじ, なかむら せいじ, すずき たかひろ)

Toshio Suzuki,^{1,**} Koji Nishikawa,¹ Seiji Nakamura¹ and Takahiro Suzuki²¹ ダイソー株式会社 R&D 本部新事業推進部
660-0842 兵庫県尼崎市大高洲町9番地² サンヨーファイン株式会社
660-0842 兵庫県尼崎市大高洲町9番地¹ DAISO CO., LTD., 9 Otakasu-cho, Amagasaki, Hyogo 660-0842, Japan² SANYO FINE CO., LTD., 9 Otakasu-cho, Amagasaki, Hyogo 660-0842, Japan

要旨：黒酵母 *Aureobasidium pullulans* 1A1株が、 β -グルカンの中でも免疫賦活活性の特に高い β -1,3-1,6-グルカンを分泌生産することに注目し、高純度で低粘度な可溶性 β -1,3-1,6-グルカン食品素材『アクア β ^{TM}』を開発した。次いで、『アクア β ^{TM}』が腸管免疫に対する免疫賦活調節効果を有することを確認した。具体的には、抗腫瘍活性ならびに抗癌転移活性を有すること、食物アレルギー改善効果を有すること、便秘改善効果を有すること、抗ストレス効果を有すること、腸管粘膜の保護作用や食後血糖の低減効果を有することを明らかにした。さらに、最近では胃潰瘍の低減効果を確認するとともにヒートショックプロテイン70 (HSP70) の誘導効果を見出した。

キーワード：黒酵母, β グルカン, 腸管免疫, 抗ストレス, ヒートショックプロテイン***

1. はじめに

β -1,3-グルカンはキノコに含まれる成分として古くから知られており、抗腫瘍活性があることが報告されている¹⁻⁴⁾。レイシなどは漢方薬として伝承され、またスエヒロタケから得られるシズフィラン (Schizophyllan), シイタケから得られるレンチナン (Lentinan) は、それぞれ β -1,6 分岐構造を有する β -1,3-グルカンを主成分としており、注射薬の抗癌剤として現在も製造販売されている。

キノコ由来以外の β -1,3-グルカンとしては、 β -1,6 分岐構造を有するパン酵母や黒酵母由来のものが知られている。その他、分岐構造は有さず β -1,3 結合と β -1,4 結合の繰り返し構造を主鎖に有するカラスムギや大麦由来のものや、 β -1,3 結合と β -1,6 結合の繰り返し構造を有するラミナランのような海草由来のものが知られている。しかし、免疫賦活という観点からは、その分子レベルのメカニズムの詳細解明がなされていないのが現状である。近年、 β -1,3-1,6-グルカンに関してはマクロファージ上のレセプターが報告されており、自然免疫を賦活する重要な抗原物質として注目

されつつある⁵⁾。

我々は黒酵母 *Aureobasidium pullulans* の1菌株が、 β -1,3-グルカンの中でも免疫賦活活性の特に高い β -1,3-1,6-グルカンを分泌生産することに注目し、高純度で低粘度な可溶性 β -1,3-1,6-グルカン食品素材を開発し、商品名『アクア β ^{TM}』として市場に提供している (表1)。既に『アクア β ^{TM}』が腸管免疫に対する免疫賦活調節効果を有すること^{6,7)}をはじめとして、抗腫瘍活性ならびに抗癌転移活性を有すること⁸⁾、食物アレルギー改善効果を有すること⁹⁾、抗ストレス効果を有すること¹⁰⁾、腸管粘膜の保護作用¹¹⁾や食後血糖の低減効果を有すること¹²⁾、その他、マダイを用いた養殖魚への抗病性の強化に関して効果のあることも明らかにした¹³⁾。さらに、最近では胃潰瘍の低減効果を確認するとともにヒートショックプロテイン70 (HSP70) の誘導効果を見出した¹⁴⁾。

本稿では、『アクア β ^{TM}』の生産法、安全性、そして種々の生理機能について紹介する。特にストレスと免疫の関係について詳細に報告するとともにヒトでの効果についても紹介する。

*本原稿は、日本応用糖質科学会平成23年度大会の技術開発賞受賞講演で一部発表された。

**連絡先 (Tel. 06-6409-0805, Fax. 06-6409-0794, E-mail: tsuzuki@daiso.co.jp)

***Key words: Black yeast, β glucan, intestinal immunity, anti stress, heat shock protein

表1. 『アクアβ™』の製品および規格

		品名		
		アクアβ 高純度パウダー	アクアβ 水溶液	アクアβ 発酵液
品質 特性	外観	淡黄色 非結晶性粉末	淡黄色 透明	淡褐色 透明
	β-1,3-1,6-グル カン(%) [*]	80%以上	2 g/L 以上	5 g/L 以上
	水分(%)	8.0%以下		
	pH	—	3.0以上4.0以下 ^{**}	
	鉛 ^{***}	20 ppm 以下	0.4 ppm 以下	
	砒素 ^{***}	2 ppm 以下	0.2 ppm 以下	
	カドミウム ^{***}	—	0.1 ppm 以下	
	スズ ^{***}	—	150 ppm 以下	
	大腸菌群	陰性	陰性	
	一般性菌数	1000個/g 以下	30個/mL 以下	
製法概略		培養液を除菌 後、エタノール 処理による精製 粉末	高純度パ ウダーを 溶解した 水溶液	培養液を 除菌後、 透析、濃 縮した発 酵液
備考		本納品ロットごとに上記品質規格項目の試験成績表を一部提出する。		

^{*}有効成分β-1,3-1,6-グルカン含量を保証。表は特性値であり、保証値ではありません。^{**}クエン酸にて pH 調整。^{***}ICP 発光法により測定。

2. 発酵法による β-1,3-1,6-グルカン『アクアβ™』の生産¹⁵⁾

我々は、黒酵母 *A. pullulans* によるβ-1,3-1,6-グルカンの発酵生産に着手した。本発酵生産は、ショ糖を単一の炭素源とする食品として安全な培地で実施できたが、得られた培養液は粘度が数千 mPa・s (cP) に達した。そこで、金属塩濃度、pH、そして温度条件等を調節するユニークな特殊処理技術により、培養液の低粘度化に成功し、工業スケールにおいて低粘度かつ高純度 β-1,3-1,6-グルカン（以後、βグルカンと略す）の安定な発酵生産法を確立した。

2.1 発酵生産について

図1にβグルカンの発酵生産プロファイルを示す。*A. pullulans* 1A1株（以後、1A1株と略す）は、好气的条件ではショ糖を炭素源として培養した場合に、ショ糖はグルコースとフラクトースに分解され、グルコース次いでフラクトースの順に資化された。それに伴ってβグルカンを産生した。さらに、培地にアスコルビン酸を添加することによりその産生量は向上し安定した。そして、βグルカンの産生に伴い培養液の粘度は最終的には数千 mPa・s 以上にまで上昇した。1A1株は不完全菌に属し一般的には菌糸体を呈するが、高生産時の菌形は酵母様を呈しており、これが黒酵母の所以である。また本菌は培養後期に黒色のメラニンを生産するが、アスコルビン酸はその産生を抑制する効果も

図1. 黒酵母のβグルカン産生培養プロファイル
糖濃度はフェノール-硫酸法による測定値を示す。

図2. アクアβのNMR解析

有している¹⁶⁾。従い、発酵工程においてアスコルビン酸の安定維持は、βグルカンの生産性と品質維持に重要なファクターである。

2.2 βグルカンの回収・精製

βグルカンを含む培養液は数千 mPa・s 以上の高粘度を示すことから、容易に微生物を除去することが困難であった。βグルカンは中性では三重らせんのリジッドな構造をとっており、アルカリ条件では一重らせんのランダムコイル構造をとることを利用して¹⁾、培養液をアルカリ条件にすることによる低粘度化法を開発した。その結果、フィルタープレスにより容易に除菌でき、さらに透析工程を経て、アルコール沈澱法による、βグルカンを高純度に回収する量産化に成功した。

エタノール沈澱法により回収されたβグルカンの定量は、グルコースを標準物質としたフェノール硫酸法により測定した。構造解析は¹³C-¹H 2次元 NMR により行った。すなわち 4.8 ppm と 4.5 ppm に現われる β-1,3 結合と β-1,6 結合の C(1)-H シグナル積算値から、β-1,3 結合を主鎖に β-1,6 結合の側鎖を有していることが示され、その分岐度は 90% 以上の高分岐度であることを確認した (図2)。また、エキソ型 β-1,3-グルカナーゼによる酵素分解生成物の解析から、グ

図 3. 予測されるアクア β の構造表 2. 『アクア β ™』の食品および化粧品素材としての安全性

試験項目	アクア β 種類	評価対象	結果
急性経口毒性試験	アクア β 1.7%水溶液	マウス	LD 50 > 1360 mg/kg (B.W.)
	アクア β パウダー (2% グルカン粉末 (培養液+CD のスプレードライ))	マウス	LD 50 > 2500 mg/kg
28日反復経口投与試験	アクア β パウダー (5wt%)	ラット	5 g/kg (B.W.) /day 問題なし
皮膚感作性試験	アクア β 0.2%水溶液	モルモット	問題なし
皮膚一次刺激性試験	アクア β 0.2, 0.5%水溶液	モルモット	問題なし
眼粘膜刺激性試験	アクア β 0.2%水溶液	ラット	問題なし
連続皮膚刺激性試験	アクア β 0.2, 0.5%水溶液	モルモット	問題なし
ヒトパッチ試験	アクア β ローション (0.2%グルカン水溶液60%配合) 高純度 β グルカン 2% (20%1,3-BG 水溶液)	ヒト	問題なし

ルコースとゲンチオビオースを生成物として確認し、図 3 に示す構造であると推定した。産生する β グルカンの分子量は、ブルランを標準物質とし、水酸化ナトリウムを展開溶媒とするゲルクロマトグラフィー分析により、数万～30 万の低分子 β グルカンであることが明らかとなった。また、本 β グルカンは一部スルホ酢酸基により置換されており、その含量はイオウ原子の元素分析の結果から約 0.1% と推測された¹⁶⁾。興味深いことに、このようにして得られた可溶性 β グルカンは、水溶液中では一部超微粒子 (<200 nm) を形成していることも明らかとなり、腸管免疫の賦活化に有効な粒子サイズであることが示唆された¹⁾。そこで我々はその特徴・効果を実証すべく、後述する生理機能について検討を進めた。

2.3 安全性について

β グルカンを産生する黒酵母 *A. pullulans* の培養液は食経験があり、増粘安定剤として「既存食品添加物」に登録され、食品に利用されている安全な素材である。2004 年 6 月の厚生労働省財団法人日本食品化学研究振興財団による

「既存添加物の安全性の見直しに関する調査研究」において、90 日間以上の反復投与試験および変異原性試験で問題ないこと（陰性であること）が報告され、食品としての安全性が改めて証明されている¹⁷⁾。我々も本 β -1,3-1,6-グルカン食品素材『アクア β ™』が安全性の高い食品であること、さらに化粧品素材としても安全であることを確認した（表 2）。このように、我々は黒酵母由来の高純度かつ低粘度の β グルカン食品素材を提供することになった。

3. β -1,3-1,6-グルカン『アクア β ™』の生理機能について

我々は、『アクア β ™』（以後、アクア β と略す）による動物を用いた経口投与実験において、種々の生理機能を確認し、新たな機能を見出した（図 4）。以下これらについて紹介する。

3.1 腸管免疫賦活効果について^{6,7)}

アクア β の腸管免疫賦活・調節効果に関しては、日本大学資源生物科学部の上野川教授らとのマウスを用いた動物実験により評価した。

マウスの Peyer's patch（パイエル板）に由来するリンパ球を用いた細胞レベルの *in vitro* 実験では、アクア β 濃度が、0～200 μ g/mL において量依存的にイムノグロブリン A (IgA) の産生が見られ、パン酵母由来のザイモサン (ZYM) や細菌の炎症性物質 (LPS) と比して高い賦活効果が見られた（図 5）。同時に、インターロイキン (IL) -5 や IL-6 のサイトカイン産生も確認できた。*in vivo* 実験では、アクア β をマウスに 7 日間、1 日マウス kg あたり 10～20 mg 経口投与し、8 日目にマウスのパイエル板由来のリンパ球を抽

図 4. アクア β の種々の生理機能 図 5. アクア β による IgA の産生 (*in vitro*)

Glu はアクア β , Zym はパン酵母由来の β グルカンであるザイモサン, LPS は細菌由来の炎症性物質を示す。* $p < 0.05$ 。

図 6. アクアβの経口投与におけるIgAの産生 (in vivo)

* $p < 0.05$.

図 7. アクアβの経口摂取による抗腫瘍効果(a)および抗癌転移効果(b)

図 8. アクアβの経口摂取による小腸粘膜の INF-γ陽性細胞およびNK 陽性細胞数

図 9. アクアβの経口摂取による卵白アルブミン (OVA) 特異的 IgE の抑制効果

出し、そのIgA産生量を測定した。アクアβは腸管免疫に作用して腸管の免疫組織であるパイエル板などのリンパ球を活性化するとともに、腸管での種々のサイトカイン類やIgAの産生誘導を促進することを明らかにした(図6)。

さらにアクアβによる腸管免疫の賦活効果は、乳酸菌との併用でも相乗効果が認められた。in vitro 実験において、アクアβと植物性乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* とを、マウス腹腔より抽出したリンパ球へ与えたところ、IgA産生を相乗的に高めることも明らかにした¹⁸⁾。

以上の結果から、アクアβが経口投与において腸管免疫に作用し、腸管のパイエル板由来のリンパ球を活性化するとともに、腸管での種々のサイトカイン類やIgA産生誘導を促進することを明らかにした。腸管は免疫の最重要リンパ器官として知られており、その大きさはヒトではテニスコート一面分といわれている。腸管は、外界からの感染の第一線の砦として重要で、その免疫機能の活性化は細菌やウイルス感染予防との関係が深い。最終的には腸管免疫から全身免疫を賦活することが示唆されており、ウイルスや細菌の感染予防剤として利用が期待される。

3.2 抗腫瘍および抗癌転移効果について⁸⁾

愛媛大学大学院医学研究科の阪中教授らとの共同研究により、アクアβの抗腫瘍および抗癌転移効果について検討を行った。10,000細胞数の colon26 癌細胞をマウス脾臓に移植し、原発腫瘍に対する抗腫瘍効果と肝臓への癌転移抑制

効果を検討した。

その結果、マウス経口投与試験では、50 mg/kg の低濃度において有意 ($p < 0.05$) に原発腫瘍抑制と肝臓への癌転移抑制効果を明らかにした(図7)。さらに、腸管でのその作用機構を明らかにするために、小腸を中心とする腸管免疫機能を検討したところ、インターフェロン-γ (INF-γ) 陽性細胞数が顕著に増加していた。すなわち、小腸粘膜組織からの INF-γ産生の増強を通して、抗腫瘍および抗癌転移効果を発揮したものと推測した。ナチュラルキラー (NK) 活性も増強する傾向が見られた(図8)。その他、腫瘍移植に伴うマウス胸腺の減弱や体重低下なども抑制されており、アクアβが免疫活性を増強することが示された。

このように、高純度のβグルカンが、経口投与において腸管免疫を活性化することにより、INF-γの産生とNK活性を増強して、抗腫瘍活性と抗癌転移活性を示すことを実証したのは本研究が初めてである。

3.3 抗I型アレルギー効果について⁹⁾

I型アレルギーに対するアクアβの効果について、愛媛大学大学院医学研究科の阪中教授らとの共同研究により検討を行った。

マウスにアクアβ含有飼料 (0, 0.25, 0.5 および 1.0%) を試験期間中 (37日間) 自由摂取させた。16日目および30日目に3mg卵白アルブミン (OVA) 生理食塩溶液を腹腔内投与し、37日目にOVA 15mgを経口投与することにより、OVA食物アレルギーを誘導させた。その結果、アレルギー誘導により増加したOVA特異的IgEが、アクアβの自由摂取により抑制されており、1%含有飼料マウスでは有

意な減少が見られた (図 9)。

また脾臓リンパ球では、 $\text{INF-}\gamma$ 、 IL12 産生増加の Th1 有意な応答が見られ、さらに小腸粘膜組織において、CD8陽性、 $\text{INF-}\gamma$ 陽性、および IgA 陽性細胞の増加が見られた (図 10)。これより、アクア β は OVA 摂取による食物アレルギー反応に対して、その原因となる OVA 特異的 IgE 産生抑制し、Th1 応答に傾倒するメカニズムにより、抗 I 型アレルギー効果を示すことが明らかになった。また OVA により誘導された食物アレルギーに対して減弱した腸管免疫システムを CD8-T 細胞、IgA 陽性細胞、そして $\text{INF-}\gamma$ 陽性細胞を増加させることにより、細菌やウイルスの進入から防御していることが示唆された。

3.4 便秘改善効果について¹⁹⁾

アクア β の花粉症への抑制効果について、社内モニターアンケートを実施検討中に、偶然に被験者らに便秘改善効果を見出すことができた。そこで、モルヒネ誘導による便秘改善を指標にそのメカニズムの検討を行った。モルヒネは、オピオイド受容体をブロックすることから、腸管の蠕動運動を止めることにより便秘を引き起こすことが知られている²⁰⁾。

そこで、ラットに便通抑制作用のあるモルヒネを経口投

図10. アクア β の経口摂取による小腸粘膜の CD8-T 細胞、 $\text{INF-}\gamma$ 陽性細胞および IgA 陽性細胞数

与して、カルミンという色素を排便マーカーとして用いて、色素が便中に出てくるまでの時間をアクア β 投与群と非投与群で比較した。アクア β 投与群では、ラット kg あたり 30 mg で有意に便の遅延を改善して、便通改善効果が得られた (図 11)。一方、300 mg で量依存的な効果が見られなかったことや、低粘度化していない高分子の β -グルカンでは効果は見られなかった。これは低粘度な β -グルカンであるアクア β が、腸管において作用しやすいことを示唆している。

3.5 自律神経系への作用について¹⁹⁾

前項の便秘改善効果のメカニズムを明らかにする目的で、アクア β の十二指腸投与による自律神経への作用について検討を行った。この研究は株式会社 ANBAS の永井先生 (大阪大学名誉教授) の協力を得て行った。自律神経とは、内臓・血管・リンパ腺などに広く分布する神経で、消化・排泄・内分泌などの生命維持に必要な機能を調節している。この自律神経系は、体を活発に動かす時に働く活動型の交感神経と、休息型の副交感神経により相互作用によりコントロールされている。なお、消化活動は副交感神経により亢進調節され、消化系臓器が活発に働くことが知られている。

絶食のラットに麻酔をかけた状態で腹部を開き、アクア β を 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 濃度に溶解した水溶液を十二指腸から投与した。胃の自律神経系に電極をセットし、その電位により胃の自律神経系の興奮度を測定した。その結果、図 12 に示すように、胃の副交感神経が水を投与した場合よりも有意に亢進されることが確認された。この結果は上述の便通改

図11. アクア β の経口摂取によるモルヒネ誘導便秘の排便改善

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

図12. アクア β の経口摂取による自律神経系に与える影響

善効果との関連が深く、アクアβを摂取することにより、自律神経系において副交感神経優位な状態を引き起こしていることが判明した。また、ストレスを制御している副腎に対しても同様の方法で、自律神経の興奮状態を測定した結果、副腎では交感神経の興奮度を減衰した(図12)。すなわち、ストレスの緩和を示唆する効果が得られ、後述のアクアβのストレス低減効果で詳細に検討された。アクアβの免疫系、内分泌系、そして自律神経系における作用メカニズムは、大変興味深いものと考えられた。

3.6 食後血糖低減効果について¹²⁾

メタボリックシンドロームなどの生活習慣病に対する関心が高まり、βグルカンのコレステロール低下作用や血糖上昇抑制作用への注目が集まっている。米国では、オーツ麦由来および大麦由来のβグルカンに対して、冠状動脈心疾患のリスク軽減効果の表示が許可されている。キノコ類、酵母、海藻由来のβグルカンについても、血糖上昇抑制効果について言及されているが、詳細な研究報告は少ない。そこで、グルコース経口投与後の血糖値上昇に対するアクアβの影響について、愛媛大学大学院医学研究科の木村先生との共同研究により検討した。

アクアβを1日あたりそれぞれ50、100、200および500 mg/kg マウスとなるように、朝晩(7:00 および 19:00)計2回、7日間経口投与した。8日目に4時間以上の絶食後、アクアβ含有水溶液に次いでグルコース水溶液(100 mg/0.2 mL/マウス)をそれぞれ経口投与した。グルコース投与前(0分)、投与後15、30、60および120分に尾静脈から微量採血し、血糖値を測定した。

その結果、コントロール群では血糖値は投与後30分まで上昇し、その後低下した。アクアβ50 mg/kg 投与群では、血糖値はグルコース投与後15分まで上昇し、30分後には血糖値の低下が見られ、投与後60分の血糖値はコントロール群と比較して有意に低下していた(図13)。100 mg/kg および200 mg/kg 投与群では、グルコース投与後15分から30分の血糖値の上昇はわずかで、その後血糖値は低下し、投与後60分の血糖値はコントロール群と比較して有意に低

図13. アクアβの経口摂取による食後血糖低減効果

下していた。しかし、500 mg/kg 投与群ではグルコース投与後15分から30分に血糖値がわずかに低下したが、投与後60分に再び上昇した後、緩やかに血糖は低下した。

一方上記の投与試験に変えて、アクアβ含有水溶液(0.1～1.0%)を用いた7日間の自由摂取飲水試験も行った。8日目の糖負荷試験時にインスリン濃度の測定(グルコース投与後15分後の値)を行ったところ、食後血糖の上昇が抑えられる傾向とともに、血中のインスリン濃度が有意に低下することを観察した。このように食後血糖値またはインスリン濃度の低下が観察されたことから、アクアβを食事に組み合わせることで、食後血糖値やインスリン分泌量のコントロールに効果があることが示唆された。引いてはメタボリックシンドロームの低減に効果が期待できる。

4. ストレスと免疫調節効果について¹⁰⁾

最近様々なところで、ストレスやストレス社会という言葉が使われ、深刻な社会現象との関係が報告されている。過度になると胃潰瘍や精神疾病の原因になることも報告されている²¹⁾。そもそもストレスは、人間の体が外界から受ける色々な刺激に対して反応するメカニズムを系統立てて考えるために、H. Selyeにより打ち立てられた学説である。Selyeらにより、ストレスは自律神経系とホルモン系に大きな影響を与えることが知られていたが、ストレスは免疫系に対しても大きな影響を与えることが示唆されている。

我々は、愛媛大学大学院医学研究科の阪中教授らとの共同研究により、アクアβがマウスを用いた経口投与実験により、顕著なストレス改善効果を持つことを見出した。さらに、ストレスが免疫に与える影響についても明らかにした。

4.1 マウスへのストレス負荷と免疫評価法

強制絶食および強制拘束ストレス負荷を与えたマウスに対して、アクアβがどのような影響を与えるか、について検討を行った。マウスは1週間の順化飼育後、水またはアクアβ(25、50または100 mg/kg マウス)を7日間連続で、毎朝経口投与された。強制拘束は、通気孔をつけた50 mLプラスチックチューブを用い、投与3、5および7日目の19:00から翌朝7:00まで12時間行った。拘束群として、強制絶食拘束群(その期間は餌と水を与えず、かつ強制拘束を行う)の他に、比較のために強制絶食群(拘束はしないがその期間は餌と水を与えない)を設け、飲食自由な正常群(コントロール)と比較した。7日目(3回目の強制拘束実施後)の拘束解除と同時に、エーテル麻酔下で無菌的に脾臓を摘出し、下大静脈から採血を行った。採取した血液は遠心分離して血漿を分離し、血中コルチコステロン濃度の測定を行った。脾臓細胞を分離し、コンカナバリンA(ConA)を10 μg/mLになるように加えて、CO₂インキュベータ(37°C, 5%CO₂)で培養した。48時間後、培養上清を回収し、培養液中のIL-12およびIL-6の定量を行った。また脾臓細胞からリンパ球を分離し、NK活性測定に供した。

NK 活性測定は、NK 感受性のマウスリンパ腫細胞 YAC-1 を蛍光標識して標的細胞を調整し、得られたマウスリンパ球と YAC-1 細胞を 100:1 になるようにマルチウェルプレートに加え、CO₂ インキュベータで 2 時間培養した。回収した培養上清の蛍光強度を測定し、標識 YAC-1 細胞の総蛍光強度に対する割合を NK 活性とした。

4.2 アクア β によるストレス低減効果

ストレス度の指標である血中コルチコステロン濃度は、拘束ストレス（強制絶食拘束群）によって正常群よりも有意に上昇し、強制絶食群だけでも増加する傾向が見られた。これに対し、アクア β 投与群では、コルチコステロン濃度の上昇を抑制する傾向が見られた。特に 50 mg/kg 投与群では、絶食拘束群および絶食群と比較して、有意な血中コルチコステロン濃度の上昇抑止が見られ、ストレスを改善する効果が見られた（図 14）。この結果、アクア β は、マウスの拘束ストレスに対して、経口投与により有意に改善効果を示すことが実証された。

この結果を受けて、我々は社内ボランティアを募り、ヒ

図 14. アクア β の経口摂取による血中コルチコステロン量への影響

図 16. アクア β の経口摂取による拘束ストレス負荷マウスの免疫賦活効果

トでの効果を 2 試験区ブラインドクロスオーバー試験により検討した。被験者 28 名に、2 週間ドリンク（100 mg アクア β 含有ドリンク、またはプラセボドリンク）を摂取して頂き、飲み始め、1 週間後、2 週間後に自覚的なストレス症状を示すアンケート（VAS 試験）と、唾液中のストレスマーカートの測定を行った。その結果、アクア β の摂取により、唾液中のコルチコステロンは有意に減少した。さらに、疲労感を主とするストレスを緩和させる働きがあることが示唆された（図 15）。これはアクア β の効果が、ヒトで実証された例である。

4.3 アクア β による免疫機能改善効果

脾臓細胞から分泌される IL-12 は、絶食拘束ストレスによって著しく低下した。これは拘束ストレスにより、免疫機能が著しく影響を受けることが明らかとなった。脾臓重量は、強制絶食群および強制絶食拘束群において正常群より有意に低下していた。

これに対してアクア β 経口投与群では、絶食拘束ストレスによる IL-12 低下を改善した（図 16）。特に 100 mg/kg 投与群では、IL-12 分泌量が絶食拘束群に比べて有意に上昇した。また、コンカナバリン A で刺激した脾臓細胞においても同様の結果が得られた。このアクア β の免疫機能改善効果は、IL-6 分泌量においても効果が認められた。なお、拘束ストレスによる脾臓重量の低下改善に対しては、アクア β 投与群に大きな差は見られなかった。

また、脾臓から分離したリンパ球の NK 活性においても、

図 15. アクア β 含有ドリンク摂取によるヒトでのストレス改善効果

(a) コルチゾール量推移、(b) 摂取 2 週ストレス VAS アンケート。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

図 17. アクアβの経口摂取による拘束ストレス負荷マウスのNK活性への効果

絶食群および絶食拘束群において著しい低下が見られたが、50 mg/kg および 100 mg/kg 投与群では、絶食拘束ストレスによるNK活性の低下を有意に改善した(図 17)。

以上のように、拘束ストレスを繰り返すことにより、血中コルチコステロン量の増加、脾臓重量の減少、脾臓からのサイトカイン(IL-6 および IL-12)産生量の低下、NK活性の低下が見られた。これに対してアクアβの経口投与により、拘束ストレスによる血中コルチコステロン量の増加を阻止し、サイトカイン産生の低下、NK活性の低下についても阻止することができた。まとめると、コルチコステロンは、マウスにとってストレス暴露により上昇するマーカーであることから、アクアβが強度なストレスの低減に関与していることが明らかになった。また拘束ストレスは、サイトカイン産生やNK活性のような免疫機能を低下させたが、アクアβの経口投与により、拘束ストレス負荷で引き起こされる免疫力の低下を改善することも確認できた。3.5 で自律

神経系へのアクアβの影響について記述したように、アクアβは交感神経を減弱し、副交感神経を優位にすることから、アクアβが、自律神経系から免疫系に関して広くその効果を有していること、そしてそれらの両系が関連し、インナーバランスを保っていることが示唆された。アクアβの内分泌系への作用メカニズムも、やがて明らかにできると考えている。

5. 胃腸粘膜の保護効果について^{11,14)}

アクアβを経口投与することによって、胃腸粘膜の保護効果を見出した。本効果は、胃腸粘膜に対して、βグルカンが直接的な薬剤への接触を妨げることから起こると考えられたが、ヒートショックプロテイン 70 (HSP70) の誘導産生とムチン多糖の産生促進に起因することが明らかとなった¹⁴⁾。

5.1 腸管粘膜保護作用について¹¹⁾

経口抗癌剤 UFT の副作用低減に関するアクアβの効果について、愛媛大学大学院医学研究科の木村先生との共同研究により検討した。既に 3.2 においてアクアβの抗腫瘍効果について報告したので本検討では、その方法を基に UFT 投与による影響を検討した。

UFT 投与では、その副作用の 1 つである下痢の発症が見られたが、アクアβを併用したマウスでは、マウス kg あたり 25~100 mg の経口投与において、下痢の発症を抑える効果が明らかになった。さらに小腸粘膜の組織状態を調べたところ、アクアβ経口投与群では、顕著に腸管粘膜の損傷を抑える効果を確認することができた(図 18)。

5.2 胃潰瘍の低減とヒートショックプロテイン 70 (HSP70) の産生¹⁴⁾

アクアβによる胃潰瘍低減効果については、熊本大学薬学部の水島教授と共同研究を行った。アクアβを、マウス

図 18. アクアβの経口摂取による UFT 副作用に対する小腸粘膜保護効果

図 19. エタノール刺激に対する胃粘膜でのミエロペルオキシダーゼ活性

ミエロペルオキシダーゼ活性は、胃粘膜損傷の指標であり、活性が高いほど損傷が大きいことを示す。

図 20. アクアβの経口摂取による HSP70 産生誘導効果

(6～8 週齢，雄) に，それぞれ kg 体重あたり 0, 5, 20, 50, 100, 200 mg 経口投与し，1 時間後に胃傷害（胃潰瘍）を誘発させるため，100% エタノールをマウス kg あたり 5 mL 経口投与した。次いで，胃傷害誘発の 4 時間後に開腹して胃を切除し，出血性損傷（hemorrhagic damage）のスコアをつけた。出血性損傷のスコアの計算は，1 mm 四角の全ての創傷の面積を測定し，全ての胃損傷インデックスを与える値を合計した。その結果，胃内へ 100% エタノールを経口投与すると重大な胃傷害を引き起こしたが，アクアβは用量依存的に胃傷害を抑制した（図 19～21）。

5.2.1 ミエロペルオキシダーゼ活性

胃傷害誘発 4 時間後のマウスを深エーテル麻酔下に死亡させ，胃を解剖し，冷生理食塩水で洗浄し，小切片に切断した。各切片サンプルをホモジナイズし，ミエロペルオキ

図 21. アクアβの経口摂取によるムチン産生亢進

シダーゼ（MPO）活性を測定した。胃の MPO 活性は，白血球による炎症性反応を示しており，その指標となる。すなわち MPO 活性は，刺激性の胃傷害において重要な指標役割を果たしている。図 19 から分かるように，エタノール投与により MPO 活性は増大したが，βグルカンの事前投与により，MPO 活性の増大は大きく抑えられ，アクアβ投与により胃傷害が低減していることを示している。

5.2.2 胃粘膜における HSP70 及びムチン産生量の測定

胃粘膜の保護因子である HSP70 およびムチン産生量に与えるアクアβの作用を検討した。HSP70 産生の評価は，免疫組織化学的解析のために，胃傷害誘発 4 時間後の胃の切片を抗 HSP70 抗体により染色し，蛍光顕微鏡で観察した。結果を図 20 に示す。胃粘膜上での HSP70 の発現は，エタノール刺激により増大し，アクアβの事前投与により一層増大した。

ムチン産生の評価は，胃傷害誘発 4 時間後の胃サンプルを，PAS 染色し，蛍光顕微鏡で観察した。結果を図 21 に示す。胃粘膜におけるムチン産生量は，エタノールの経口投与により減少したが，βグルカンの事前経口投与によりその減少が抑制され，正常量に回復した。また，エタノールを投与せず，アクアβのみを投与した場合に，ムチン量は増大した。

このように，アクアβの経口投与により，エタノールにより誘発させた胃損傷（胃潰瘍）を低減することが明らかとなった。その防御メカニズムは，HSP70 の誘導産生とムチン産生量の増大による胃粘膜の保護効果であることが明らかとなった。このように βグルカンが HSP70 を誘導産生することは初めての報告である。

6. おわりに

我々は，独自の発酵生産技術と精製技術の開発により，高純度の可溶性 β -1,3-1,6-グルカン素材『アクアβ™』を開

発し市場に提供している。『アクアβ^{TM}』の生理機能は、まず腸管免疫を賦活・調節することに起因するものと考えられる。さらに、分子レベルにおいて、『アクアβ^{TM}』と Toll-like レセプターおよび Dectin 1 との免疫賦活機能における相互作用の科学的証明が待たれるところである^{17,22)}。一方、自律神経系にもレセプターを介して作用し、ストレスの改善などの種々の生理機能に効果を有することが示唆された。今後は、本 β グルカンの免疫賦活機能との相互作用メカニズムだけでなく、さらには自律神経系や内分泌系との作用メカニズムについても科学的証明が必要である。高純度の可溶化 β グルカン素材『アクアβ^{TM}』が、ストレスの多い現代社会と高齢化社会に向けた有効な健康食品素材として、そして予防医学分野への有用性に富む機能性食品素材として認められることを期待する。最近では、アクアβはその三重ラセン状の特徴ある構造から、ナノサイズのバイオマテリアルとして、また止血剤や DDS として医療分野への応用が注目されている²³⁾。

謝辞

本研究遂行に関して終始ご指導賜り、叱咤激励を頂きました。また大阪市立大学名誉教授 南浦能至先生に深くお礼申し上げます。また腸管免疫に関する研究でご指導いただきました東京大学名誉教授、日本大学生物資源科学部教授 上野川修一先生に深謝いたします。また、種々の生理機能に関する研究でご指導いただきました愛媛大学大学院医学研究科教授 阪中雅広先生、同講師 木村善行先生、石川県立大学生物資源工学研究所教授 山本憲二先生、慶應義塾大学大学院薬学研究科教授 水島 徹先生に感謝いたします。そして本研究に関してご指導いただきました諸先生方に感謝いたします。最後に、本開発にご協力頂きましたダイソー株式会社ならびに DS ウェルフーズ株式会社の皆様に感謝いたします。

文献

- 1) 梶浦正俊, 須賀哲也: 微粒子化 β-グルカン (Lentinan) 含有機能性食品の開発. 化学工業, **55**, 466-475 (2004).
- 2) 宿前利郎: 真菌 β-1,3-グルカンの構造と生理活性. 薬学雑誌, **120**, 413-431 (2000).
- 3) 大野尚仁: β-グルカンの生態防御修飾作用. 日本細菌学雑誌, **55**, 527-537 (2000).
- 4) N. Ohno: Immunopharmacological activity of polysaccharides, *Fragrance J.*, No.5, 70-75 (1995).
- 5) B. N. Gantner, R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira and D. M. Underhill: Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll like receptor 2. *J. Exp. Med.*, **197**, 1107-1117 (2003).
- 6) T. Suzuki, A. Hosono, S. Hachimura, T. Suzuki and S. Kaminokawa: Modulation of cytokine and immunoglobulin A release by β-(1,3-1,6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* strain 1A1. in *Animal Cell Tech.: Basic & Applied Aspects*, Iijima, S. and Nishijima, K. (eds.), vol. 14, Springer, Tokyo, pp. 369-375 (2004).
- 7) 鈴木隆浩, 細野 朗, 八村敏志, 鈴木利雄, 上野川修一: 黒酵母由来高純度 β-(1,3-1,6)-グルカンの摂取によって誘導される免疫調節効果について. 2005 年度日本農芸化学会要旨集, p. 279 (2005).
- 8) Y. Kimura, M. Sumiyoshi, T. Suzuki and M. Sakanaka: Antitumor and Antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight β-1,3-D-glucan (branch β-1,6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. *Anticancer Res.*, **26**, 4131-4142 (2006).
- 9) Y. Kimura, M. Sumiyoshi, T. Suzuki, T. Suzuki and M. Sakanaka: Inhibitory effects of water-soluble low-molecular-weight β-(1,3-1,6)-D-glucan purified from *Aureobasidium pullulans* GM-NH-1A1 strain on food allergic reaction in mice. *Int. Immunopharmacol.*, **7**, 963-972 (2007).
- 10) Y. Kimura, M. Sumiyoshi, T. Suzuki, T. Suzuki and M. Sakanaka: Effects of water-soluble low-molecular-weight β-1,3-D-glucan (branch β-1,6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast on restraint stress in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**, 1137-1144 (2007).
- 11) Y. Kimura, M. Sumiyoshi and T. Suzuki: Protective effects of water-soluble low-molecular-weight β-(1,3-1,6)-D-glucan purified from *Aureobasidium pullulans* GM-NH-1A1 against UFT toxicity in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 795-800 (2009).
- 12) 住吉真帆, 鈴木利雄, 木村善行: グルコース負荷試験における血糖値および血中インスリン濃度に及ぼす黒酵母 (*Aureobasidium pullulans* 1A1) から単離した水溶性低分子の分岐鎖 β-1,6-結合を有する β-1,3-D-グルカンの影響. 医学と薬学, **61**, 115-119 (2009).
- 13) 石丸克也, 鈴木利雄, 古川喜朗, 村田 修, 熊井英水: "黒酵母" *Aureobasidium pullulans* 1A1 株産生 β-グルカンのマダイ抗病性に対する効果. 2005 年度日本水産学会要旨集, p. 230 (2005).
- 14) K. Tanaka, Y. Tanaka, T. Suzuki and T. Mizushima: Protective effect of β-(1,3-1,6)-D-glucan against irritant-induced gastric lesions, *Br. J. Nutr.*, **106**, 475-485 (2011).
- 15) T. Suzuki, S. Nakamura, K. Nishikawa, S. Nakayama and T. Suzuki: Production of highly purified β-glucan from *Aureobasidium pullulans* and its characteristics, *Food Funct.*, **2**, 45-50 (2006).
- 16) N. Hamada and Y. Tsujisaka: The structure of the carbohydrate moiety of an acidic polysaccharide produced by *Aureobasidium* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1167-1172 (1983).
- 17) 厚生労働省薬事・食品衛生審議会添加物部会: 「既存添加物の安全性の見直しに関する調査研究」, 平成 16 年 6 月 24 日, 財団法人日本食品化学研究振興財団 (2004).
- 18) 城戸優英, 鈴木利雄, 和田 潤, 山本憲二: *Aureobasidium pullulans* 1A1 の産生する β グルカンと乳酸菌体による IgA 産生促進相乗効果. 2009 年度生物工学会大会要旨集, p.183 (2009).
- 19) 鈴木隆浩, 中村誠司, 鈴木利雄: 黒酵母由来高純度 β-(1,3-1,6)-グルカン摂取による便秘改善効果と自律神経系への作用について. 2006 年度日本応用糖質学会大会要旨集, p.28 (2006).
- 20) 田中千賀子: オピオイド鎮痛薬と拮抗薬. 「NEW 薬理学」, 加藤隆一編, p.356, 南江堂, 東京 (1989).
- 21) 星 恵子: 「ストレスと免疫」, ブルーバックス, 講談社, 東京 (1993).
- 22) G.D. Brown and S. Gordon: Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, **413**, 36-37 (2001).
- 23) 鈴木利雄, 長崎 健: 健康・医療用マテリアルとしての β-1,3-グルカン. 機能材料, **30**, 54-62 (2010).