

# ハナビラタケ子実体および脂質成分の免疫賦活作用

Immunomodulatory activity of the Lipids components in the fruit-body of *Sparassis crispa*

庄 條 愛 子<sup>\*1,2</sup>・古 郷 加 奈<sup>\*1,2</sup>  
山本(合田)麗奈<sup>\*1</sup>・小 林 貴美子<sup>\*1</sup>  
中 崇<sup>\*4</sup>・藤 原 永 年<sup>\*3</sup>  
北 村 進 一<sup>\*2</sup>・水 野 淨 子<sup>\*1,2</sup>

キーワード ハナビラタケ、脂質成分、免疫賦活、IgA

## I. はじめに

ハナビラタケ *Sparassis crispa* は、担子菌門ハラタケ綱タマチョレイタケ目ハナビラタケ科ハナビラタケ属に分類されるキノコであり、近年、人工栽培技術が確立したことから市場での販売が増加している。ハナビラタケは他のキノコに比べて 1,3- $\beta$ -グルカンを高濃度に含有し<sup>1)</sup>、抗腫瘍作用<sup>2)</sup>、血糖値低下作用<sup>3)4)</sup>、全身性の免疫賦活作用<sup>1)</sup>やアレルギー抑制作用<sup>5)</sup>などの高い生理作用が報告されている。これらのハナビラタケに関する報告の多くはハナビラタケ由来の  $\beta$ -グルカン作用によるものであるが、 $\beta$ -グルカンの含まれない低分子画分においても、高い損傷治癒効果が報告されている<sup>6)</sup>。また、キノコには微量ながら脂質成分が含ま

れ<sup>7)</sup>、脂質成分は免疫賦活作用、抗酸化作用を有することが報告されていることから<sup>1)</sup>、ハナビラタケ子実体およびハナビラタケ脂質成分の免疫賦活作用について検討した。

## II. 材料および方法

### 1. ハナビラタケ子実体の調整と脂質成分の調整

・ハナビラタケ乾燥粉末の調整

本実験には(株)かつらぎ産業から分与頂いたハナビラタケを用いた。培養基質上部に形成されたハナビラタケ子実体を採取し、凍結真空乾燥させた後に粉末化してハナビラタケ粉末を調整した。このハナビラタケ粉末を用いて脂質成分抽出および動物投与試験を実施した。

\*1 相愛大学人間発達学部発達栄養学科

\*2 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

\*3 帝塚山大学現代生活学部食物栄養学科

\*4 (株) MBR

・ハナビラタケ脂質成分の抽出、総脂質およびアルカリ加水分解脂質の調整

Lee et al.<sup>8)</sup> および小林ら<sup>9)</sup>の方法に従い、ハナビラタケ粉末を水：クロロホルム：メタノール（65：35：8、和光純薬工業、大阪）に浸漬させて総脂質（TL）を抽出し、水酸化ナトリウム（和光純薬工業）を用いてアルカリ加水分解した後に酢酸（和光純薬工業）で中和したものをアルカリ加水分解脂質（ASL）とした。薄層クロマトグラフィー（Silica gel G, Analtch Inc, Newark, DE）を用いてハナビラタケ TL、ASL の分析を行った。展開溶媒にはクロロホルム：メタノール：水（85：15：1）、スポットの検出には 50% 硫酸水溶液（和光純薬工業）を用いた。

## 2. 動物投与試験

動物投与試験は、大阪府立大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

上記方法で調整したハナビラタケ粉末は表 1 の組成で調整した成体マウス飼料 AIN-93 のセルロースと置き換えて 2% 添加し、TL および ASL はハナビラタケ粉末添加量（2%）に相当するハナビラタケ粉末から抽出したサンプルを

表 1 成体マウス飼料（AIN-93）組成

(%)	対照	ハナビラタケ粉末
重酒石酸コリン	0.25	0.25
L-シスチン	0.18	0.18
ミネラルミックス	3.50	3.50
ミルクカゼイン	14.00	14.00
ビタミンミックス	1.00	1.00
精製大豆油	4.00	4.00
$\beta$ 化コーンスターチ	46.57	46.57
$\alpha$ 化コーンスターチ	15.50	15.50
グラニュー糖	10.00	10.00
セルロースパウダー	5.00	3.00
サンプル	—	2.00
合計	100.00	100.00

窒素乾固した後、エタノール（和光純薬工業）で再溶解し、セルロースと置き換えて添加した。

Balb/c マウス（6 週齢、雄、紀和実験動物、和歌山）を対照飼料で一週間の馴化飼育した後、体重および摂食量により一群あたり 6 匹ずつ群わけした。各試験区のマウスは、対照飼料および試験飼料で 2 週間飼育した。飼育は室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、明暗調節下（8:00~20:00）の動物実験室で行い、自由摂食・摂水とした。

## 3. 解剖時血液分析、血中 $\text{INF-}\gamma$ 濃度測定、糞

### IgA 濃度測定、小腸パイエル板表面積計測

ハナビラタケ粉末および脂質成分添加飼料の投与前と 24 時間後に新鮮糞（30 分間排出糞）を回収し、PBS で可溶化・希釈した後、Mouse IgA ELISA（Bethyl Lab Inc., Montgomery, USA）を用いて IgA 濃度を測定した。

飼育期間終了時に各区のマウスを 4 時間絶食させた後、エーテル麻酔下で下大静脈から静脈血を採取し、失血死させた後に各臓器のサンプリングを行った。血糖値、血中中性脂肪、血中総コレステロール濃度は市販のキット（和光純薬工業）を用いて測定し、血中  $\text{INF-}\gamma$  濃度は、Mouse  $\text{INF-}\gamma$  Quantikins Kit（R&D system, Minneapolis, USA）を用いて測定した。

小腸パイエル板表面積は、ホルマリン固定した小腸表面のパイエル板の長径と短径の長さをデジタルノギスで測定し、乗じることで算出した。

## 4. 統計解析

すべてのデータは平均値  $\pm$  標準誤差で表し、群間の有意差検定は Stat View（SAS Institute, Cary, North Carolina, USA）による分散分析後、Bonferroni/Dunn 検定を実施した。

### Ⅲ. 結果および考察

#### 1. ハナビラタケ脂質成分の TLC 分析

TLC を用いてハナビラタケ脂質成分の分布を検討した (図 1)。マイタケおよびエノキタケに含まれる糖脂質 glucosyl- $\beta$  (1-1)-ceramide (GSL-1) は化学構造が既知であることから<sup>9)</sup>ハナビラタケとの比較のため、同じプレートに展開した。ハナビラタケ ASL にはエノキ、マイタケの ASL に認められる GSL 1 および 2 とほぼ同じ部分にスポットが確認された。この結果から、ハナビラタケにもエノキ、マイタケと非常に構造の類似した糖脂質が含まれることが推察された。

#### 2. 動物投与試験

対照区、ハナビラタケ粉末区および脂質添加区の摂食量及び体重増加量に差は認められず

(表 2)、解剖時の各臓器重量においても各区の間に有意な差は認められなかった (表 3)。これらのことからハナビラタケ粉末および脂質成分は、マウスの食嗜好および成長には悪影響を及ぼすものではないことが推察された。

飼育期間終了時の血中中性脂肪、総コレステロール濃度は各区で大きな差は認められなかったが、血糖値は対照区に比べてハナビラタケ粉末区、TL 区および ASL 区で有意に低い値を示した (表 4)。ハナビラタケの血糖値低下作用は、ハナビラタケ粉末を 5% 混合した飼料で II 型糖尿病モデルマウス (KK-Ay マウス) を 7 週間飼育した場合にも観察されており、血中アディポネクチン濃度の上昇を介したインスリン抵抗性の改善によるものと考察されている<sup>4)</sup>。一方、高山らはハナビラタケ粉末を 9.5% 添加した高脂肪飼料で C57BL/6J マウスを 6 週間飼育した場合にも血糖値は対照区に比べて有意に低い値を示すことを明らかにしている

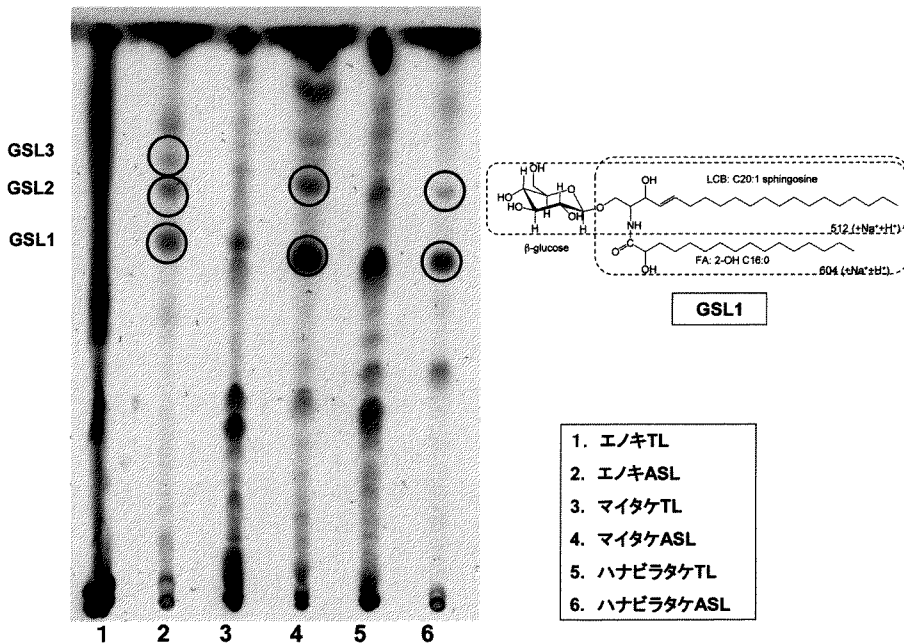


図 1 エノキ、マイタケおよびハナビラタケ総脂質、アルカリ安定化脂質の TLC 分析

表 2 摂食量および体重増加量

	対照	ハナビラタケ粉末	TL	ASL
摂食量 (g)	44.4 ± 3.8	47.5 ± 2.5	47.2 ± 3.3	50.8 ± 0.9
体重増加量 (g)	3.79 ± 0.41	3.30 ± 0.67	3.30 ± 0.78	3.48 ± 0.47

表 3 解剖時臓器重量 (比体重)

%/体重	対照	ハナビラタケ粉末	TL	ASL
肝臓	5.08 ± 0.10	4.93 ± 0.11	5.06 ± 0.14	4.97 ± 0.11
腎臓	1.45 ± 0.02	1.48 ± 0.04	1.44 ± 0.09	1.41 ± 0.03
脾臓	1.06 ± 0.03	0.93 ± 0.10	1.05 ± 0.13	1.27 ± 0.19
内臓脂肪	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.02

表 4 解剖時血液成分

mg/dl	対照	ハナビラタケ粉末	TL	ASL
血糖値	225.8 ± 6.4	199.6 ± 5.3*	188.5 ± 5.7*	186.4 ± 7.5**
中性脂肪	123.0 ± 6.5	156 ± 11.1	112 ± 15.3	131.7 ± 17.3
総コレステロール	81.2 ± 2.6	73.7 ± 3.4	72.2 ± 2.7	70.1 ± 3.6

\*対照区との間に有意差あり (P&lt;0.05)

\*\*対照区との間に有意差あり (P&lt;0.001)

が、血清アディポネクチン濃度の上昇は認められないことから、メタボリックシンドローム病態モデルの違いによってハナビラタケの血糖値低下機序が異なることを推察している<sup>3)</sup>。本実験はこれらの報告と実験対象、基礎飼料組成、ハナビラタケ粉末混餌量、飼育期間が異なるものの、ハナビラタケ粉末投与マウスにおいて血糖値低下作用が観察されたことから、ハナビラタケ子実体は低濃度・短期間の投与によっても血糖値の低下作用があること、また血糖値低下作用は脂質成分のみでも認められたことから、血糖値低下作用は脂質成分に起因する可能性が示唆された。

小腸パイエル板表面積は、対照区に比べてハナビラタケ粉末区および脂質成分投与区で増加する傾向が認められた (図2)。糞 IgA 濃度は、ハナビラタケ粉末区および脂質成分投与区において投与前に比べて 24 時間後に著しく高い値

を示し、さらに対照区とハナビラタケ投与区の間には有意な差が認められた (P<0.05、図3)。また、解剖時の血中 INF- $\gamma$  濃度は対照区に比べて、ハナビラタケ粉末および脂質成分投与マウスで著しく高い値を示し、TL 区および ASL 区では対照区との間に有意な差が認められた (図4、TL: p<0.001、ASL: P<0.05)。

小腸パイエル板は多数のリンパ球が集めたリンパ小節であり、腸管免疫の中心的役割を果たすと同時に免疫寛容発現の出発点であることが知られている。小腸内に取り込まれた物質はパイエル板 M 細胞に取り込まれて抗原認識されると、パイエル板 B 細胞が IgA+B 細胞に形質変化し IgA を放出して抗原の中和を行うとともに、パイエル板リンパ球はホーミング現象により小腸から全身免疫系付属組織に移動し、免疫情報を伝搬させる機能も有する<sup>10)11)</sup>。Segawa らは、乳酸菌死菌体をアレルギーモデ

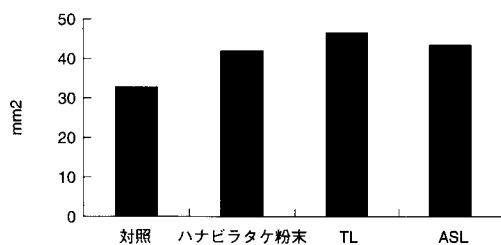


図2 小腸パイエル板表面積

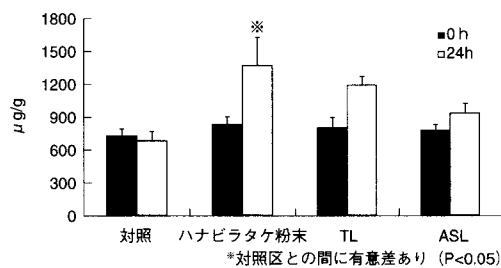


図3 糞 IgA 濃度

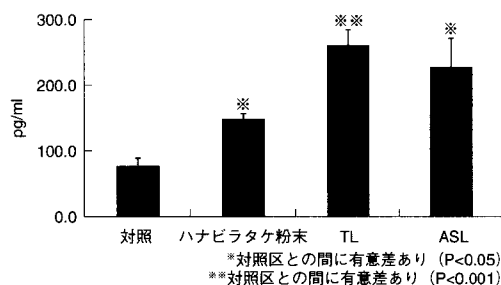


図4 血中 IFN-γ 濃度

ルマウスに投与することでアレルギー症状の低減とパイエル板での IL-12 濃度の上昇を報告しており、乳酸菌死菌体成分のパイエル板での抗原認識とパイエル板リンパ球の IL-12 放出、および IL-12 による NK 細胞からの INF-γ 産生の促進を介した IgE 抑制がアレルギー症状を軽減し、NK 細胞の活性化も促すことを推察している<sup>12)</sup>。本実験のパイエル板表面積の増加と糞 IgA 濃度の増加から、ハナビラタケ成分は消化されることなく小腸まで到達してパイエル板で抗原認識されること、ハナビラタケ成分に対する IgA 産生細胞が増加し IgA 産生量が増加すること、パイエル板でハナビラタケ成分を

認識したリンパ球がホーミング現象により全身免疫系付属組織に移動し、NK 細胞を活性化することで IFN-γ 産生が促進されることで血濃度が上昇することが推察され、腸管免疫を介した全身性の免疫賦活作用が示唆された。

以上の結果から、ハナビラタケはエノキヤマイタケと共通する糖脂質を含有すること、ハナビラタケ子実体および脂質成分には血糖値低下作用や腸管免疫を介した全身性の免疫賦活物質が含まれることが示唆された。

#### 引用文献

- 1) T Kimura Review Article : Natural Products and Biological Activity of the Pharmacologically Active Cauliflower Mushroom *Sparassis crispa*. Bio-Med Research International 2013, Article ID 982317, 9 pages (2013)
- 2) T Hashimoto, K Yamamoto, T Inose, T Kimura Novel Phthalide Compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), Hanabiratakelide A-C, Exhibiting Anti-cancer Related Activity Biological and Pharmaceutical Bulletin 33, 1355 – 1359 (2010)
- 3) 高山侑樹, 寺西博美, 錦見盛光, 古市幸生 高脂肪食投与のメタボリックシンドロームモデルマウス (C 57 BL/6J) の血糖値と脂質代謝に及ぼす食用キノコの影響 名古屋女子大学紀要 57, 35-43 (2011)
- 4) K Yamamoto, T Kimura Dietary *Sparassis crispa* (Hanabiratake) ameliorates plasma levels of adiponectin and glucose in type 2 diabetic mice Journal of Health Science 56(5), 541-546 (2010)
- 5) M Yao, K Yamamoto, T Kimura, M Dombo Effects of Hanabiratake (*Sparassis crispa*) on allergic rhinitis in OVA-sensitized mice Food Science and Technology Research 14(6), 589-594 (2008)
- 6) 山本恭介, 西川善弘, 木村隆, 鈍宝宗彦, 松浦成昭, 杉立彰夫 ハナビラタケ (*Sparassis crispa*) 子実体由来低分子画分の担癌マウスに対する抗腫瘍作用 日本食品科学工学会誌 54, 419-423 (2007)
- 7) 吉田博, 加藤智恵 ハナビラタケの子実体発育過程における脂質成分の変化 日本きのこ

- 学会誌 16(3), 129-133 (2008)
- 8) M Lees, J Folch, GH Sloane-Stanley A simple procedure for the preparation of brain sulphatides *Journal of Neurochemistry* 4(1), 9-18 (1959)
  - 9) 小林貴美子、合田麗奈、水野浄子、中崇、土江松美、前田伸司、藤原永年 担子菌由来スフィンゴ糖脂質の構造解析 相愛大学研究論集 28, 203-213 (2012)
  - 10) 清原寛章、松崎敏明、松本司、永井隆之、山田陽城 和漢生薬由来の腸管パイエル板免疫機能調節多糖の活性発現糖鎖と作用の解析 薬学雑誌 128(5), 709-716 (2008)
  - 11) B Corthésy, HR Gaskins A Mercenier Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system *J. Nutr.* 137(3), 781 S-790 (2007)
  - 12) S Segawa, A Hayashi, Y Nakakita, H Kaneda, J Watari, H Yasui Oral Administration of Heat-Killed *Lactobacillus brevis* SBC 8803 Ameliorates the Development of Dermatitis and Inhibits Immunoglobulin E Production in Atopic Dermatitis Model NC/Nga Mice *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(5), 884-889 (2008)