

報文

麹菌発酵大豆培養物（イムバランス）の Th2 サイトカイン抑制作用とその活性成分について  
Inhibitory effects of fermented soybean culture (ImmuBalance®) and that activity component on  
T-helper type 2 responses

眞岡孝至\*<sup>1</sup>、安井菜穂美<sup>2</sup>、根岸裕子<sup>2</sup>、池田克己<sup>2</sup>、天海智博<sup>3</sup>  
(投稿日：2017.3.30、受理日：2017.5.9)

麹菌発酵大豆培養物（イムバランス）に含まれるアレルギー反応の抑制活性物質について検討した。ヘルパーT細胞(Th)2 サイトカインの産生抑制を指標としてゲルろ過 HPLC でイムバランスに含まれる活性成分を分画した。その結果、分子量 10,000 程度の水溶性多糖類画分に活性が認められた。この活性成分の構造を NMR および糖の加水分解により検討した。この多糖類は大豆細胞壁の不溶性多糖を味噌用麹菌 (*Aspergillus oryzae*) が低分子可溶化したもの、すなわち醤油多糖（アラビノガラクトタンとアラビノキシラン）類似の物質であることが明らかになった。さらにこの多糖類画分には共存する乳酸菌 (*Enterococcus faecium* および *Pediococcus parvulus*) 由来の水溶性多糖類も含まれることが分かった。

キーワード：イムバランス、麹菌、麹多糖、Th2 サイトカイン抑制作用

## 1. 緒言

疫学調査では、日本伝統な食文化である主食の米飯に加えて、大豆、魚、野菜や海

藻などの食材が長寿国の“秘密”であり、特に味噌など麹菌による発酵大豆食品を日常的に摂取していることが、欧米人に比べて日本人の乳がん、前立腺がん及び心臓疾患などの発症率や死亡率を低減させている要因として知られている。一方では、全人口の 20~30%が何らかのアレルギーを持つといわれている<sup>1)</sup>。その数は年々増加している。環境要因及び食事の欧米化などがアレルギー罹患率の増加の原因と考えられる。喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、花粉症などのアレルギー疾患は、生活の質を低下させる深刻な社会問題となっている。これらのアレルギーの治療法は対症療法が

<sup>1</sup>生産開発科学研究所

〒606-0805 京都市左京区下鴨森本町 15

<sup>2</sup>武庫川女子大学薬学部

〒663-8179 西宮市甲子園九番町 11-68

<sup>3</sup>ニチモウバイオティクス株式会社

〒140-0002 東京都品川区東品川 2 丁目 2 番 20 号

\*著者連絡先 E-mail: [maoka@mbox.kyoto-inet.or.jp](mailto:maoka@mbox.kyoto-inet.or.jp)

ほとんどで、未だに根治療法は開発されていない。そこで、副作用のない安全かつ有効な天然成分由来の物質に注目が集まっている。

イムバランス (ImmuBalance) は遺伝子組み換えしていない脱脂大豆をニチモウバイオティックス (株) の開発した独自の発酵技術により味噌用麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を用いて発酵させたものである。すなわち、日本の伝統的な麹菌発酵技術に基づいて味噌用麹菌 (*A. oryzae*) を脱脂大豆に発酵させ、麹菌が十分繁殖した時点で製麹を終了してタンパク質と多糖類を加水分解して低分子化させる。これとともに共存する乳酸菌 (*Enterococcus faecium* および *Pediococcus parvulus*) による乳酸発酵によって培養物を酸性にして雑菌の繁殖を抑えることで麹菌、乳酸菌発酵させたものである。その製造技術は日本 (日本特許: 2696057 号, 3014145 号)、米国 (US Patent No.: 5885632)、欧州 (EP 0682877) の特許を取得している。イムバランスのアレルギー反応抑制作用は基礎研究及び臨床研究においてすでに認められる<sup>2-6)</sup>。

アレルギー免疫はヘルパーT (Th) 細胞が産生するサイトカインの種類によって Th1、Th2、Th17、iTreg (inducible regulatory T 細胞) の少なくとも 4 種類に分類される。通常は互いの機能を抑制しあっているのでバランスを取りながら免疫反応を担っているが、そのバランスが崩れて Th2 細胞優位になった場合に、アレルギー疾患が発症すると考えられている。今回、イムバランスに含まれる Th2 サイトカインの産生抑制成分について検討したので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 装置

分取ゲルろ過クロマトグラフィーは LC-908 クロマトグラフ (日本分析工業) にゲルろ過カラム JAIGEL GS320 (日本分析工業、排除限界分子量 40,000 Da) を 2 本直列に繋ぎ、蒸留水を移動相 (流速 3.8 mL/min) とした。成分の検出は示差屈折 (RI) による。分子量の標準マーカーとしてポリエチレングリコールを用いた。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz) および <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) は Inova 500 (Varian) で重水 (D<sub>2</sub>O) を溶媒として測定した。ガスクロマトグラフは Hewlett-Packard 6890:5973 GC/MS システムを用いた。

### 2.2 多糖類の構成糖の検討

多糖類を塩酸で加水分解して得られた糖はトリメチルシリル化した後 6890:5973 GC/MS システム (Hewlett-Packard) で DB17 カラムを用いて分析した。ガスクロマトグラフィーの昇温条件は初めに 180°C で 2 分間保ちその後 2°C/min で 260°C まで昇温した後、260°C で 20 分間保った。糖の同定は標品とのリテンションタイムの比較による。

### 2.3 サイトカインの産生抑制作用の検討

AKR マウス由来のコンアルブミン (CA: 卵白アレルギー) 特異的 Th2 細胞クローンである D10.G4.1 (D10) 細胞 (TIB224) を米国細胞株・微生物株・遺伝子バンク (ATCC) より得て AKR マウス B 細胞 (脾臓の細胞) と 1:5 の量比で混合培養することにより D10 細胞を継代した。500,000 cell/mL の D10 細胞を調製し、CA(-)

培養液を変更し二日間培養した後実験に供した<sup>7)</sup>。24 ウェルプレートに 500,000 cell/mL の D10 細胞を 1mL 播き、卵白アレルギーを加えないものをネガティブ対照とした (CA-)。ポジティブ対照には卵白アレルギーを 50 $\mu$ g/mL 加えたものを用いた (CA+)。さらにポジティブ対照として卵白アレルギーにデキサメタゾン (DEX) を添加した群を用いた (DEX/CA+)。試験群は卵白アレルギーを添加し、イムバランス水抽出物のゲルろ過クロマトグラフィーによって得られた Fr.1 (Fig. 1) の凍結乾燥物を 50ng/mL を加えたもの (Fr. 1/CA+)、同じく Fr. 2 の凍結乾燥物を 50ng/mL を加えたもの (Fr. 2/CA+) を用いた。各群は 5%CO<sub>2</sub> 下 37°C のインキュベーターにて培養した。72 時間培養の後、各群の上澄みを回収して培養液の IL-4 含量 (ng/mg protein) を ELISA 法によって測定した。この細胞試験を 3 回繰り返し実施した。

### 3.1 イムバランスの構成成分の分子量分布による分離

まずイムバランス水溶性成分の構成を検討するため JAIGEL GS320 を用いるゲルろ過クロマトグラフィーを行って構成成分のプロフィールを見た (Fig. 1)。JAIGEL GS320 は排除限界分子量 (プルラン) 40,000 のゲルろ過カラムである。Fig. 1 にイムバランスのクロマトグラムを示した。それぞれの成分の分子量はポリエチレングリコール (Wako) を分子量マーカーとしてそのリテンションタイムから推定した。Fr. 1 は 35~40 分にかけて溶出する。ポリエチレングリコール 6,000 (平均分子量 7,300~9,300) の溶出時間が 40~45 分であることから Fr. 1 の分子量は 10,000 程度であると考えられる。Fr. 2 はその溶出リテンションタイムが 60~75 分でありグルコースとの比較 (溶出時間 65~70 分) から分子量は 500~100 と考えられる。

### 3. 結果および考察

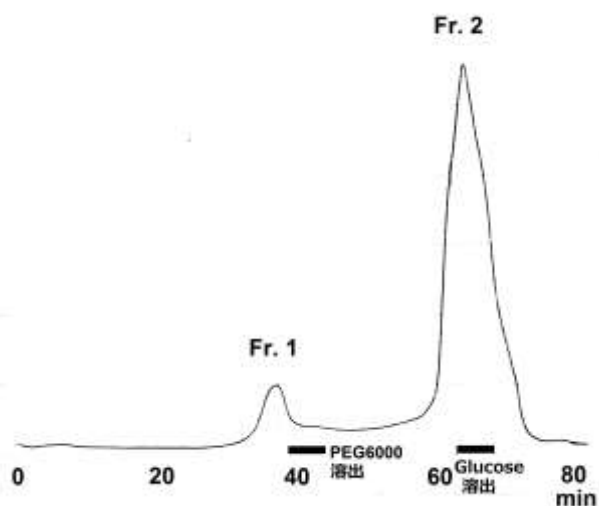


Fig. 1 イムバランス水溶性成分のゲルろ過クロマトグラム  
 固定相 : JAIGEL GS-230 $\times$ 2、移動相 : 水、流速 : 3.80 ml/min、検出 : RI、なお標準物質として用いた PEG 6000 とグルコースの溶出時間を図の下に黒線で示した。

### 3.2 イムバランスから分離したフラクションの Th2 サイトカイン抑制作用

イムバランスから分離した Fr. 1 および Fr. 2 の Th2 サイトカイン抑制効果を Fig. 2 に示した。Th2 サイトカイン抑制作用は Fr. 1 に顕著に見られた。すなわち Fr. 1 添加群は卵白アレルギー添加群 (CA+群：ポジティブ対照) に対して約 50% のサイトカインの産生抑制を示した。この群の IL-4 含量は卵白アレルギーを加えていないネガティブ群 (CA-) とほぼ同じであった。一方 Fr. 2 添加群はポジティブ対照に対して 10% ほどの抑制効果しか示さなかった。この結果からイムバランスの Th2 サイトカイン抑制作用は Fr. 1 に含まれる成分に存在する事が明らかになった。

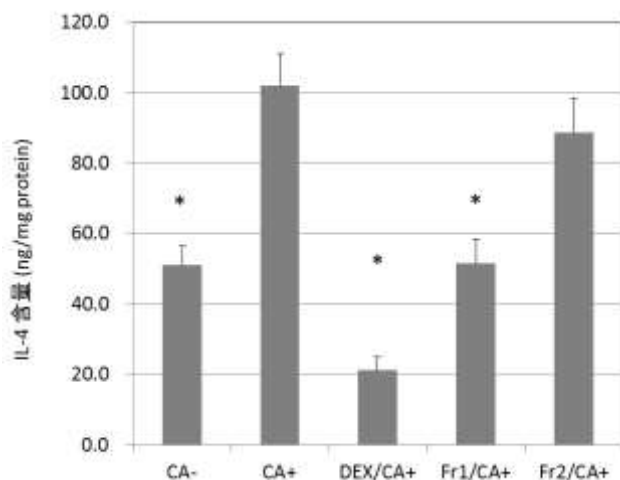


Fig. 2. イムバランスから分離したフラクションの Th2 サイトカイン抑制作用  
 CA-：卵白アレルギー無添加群 (ネガティブ対照)、CA+：卵白アレルギー添加群 (ポジティブ対照)、DEX/CA+：卵白アレルギーにデキサメタゾン (DEX) 添加をした群、Fr. 1/CA+：卵白アレルギーに Fr. 1 の凍結乾燥物 50ng/mL を添加した群、Fr. 2/CA+：卵白アレルギーに Fr. 2 の凍結乾燥物 50ng/mL を添加した群。(n=3, \* p<0.05 vs CA+群)

### 3.3 イムバランス高分子成分のキャラクターゼーション

続いて顕著な Th-2 サイトカイン抑制作用が認められた高分子画分の構成成分について検討した。すなわちゲルろ過クロマトグラフィーによって高分子画分である Fr. 1 を分取したのち凍結乾燥して得られた残渣を重水に溶解して <sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR によりその構造を検討した。Fig. 3 にイムバランスの高分子画分の NMR を示す。<sup>1</sup>H NMR では 3.6 ppm から 4.3 ppm にかけてのブロードなシグナルと 5.0 ppm から 5.2 ppm にかけてのブロードなシグナルが見られた。このシグナルパターンは多糖類に特徴的なシグナルパターンである。すなわち 3.6 ppm から 4.3 ppm にかけてのシグナルは糖の H-2 から H-6 位の 5.0 ppm から 5.2 ppm にかけてのシグナルは糖の H-1 位のシグナルと帰属される。<sup>13</sup>C NMR では 60 ppm から 85 ppm にかけてのブロードなシグナルと 107 ppm 付近のシグナルが見られた。同様に 60 ppm から 85 ppm にかけてのシグナルは糖の C-2 位から C-6 位のシグナル、107 ppm 付近のシグナルは糖の C-1 位のシグナルと帰属できる。したがってイムバランスの高分子画分は主に多糖類から構成されることが分かった。

この多糖類の構成糖を検討するため塩酸で加水分解して得られた単糖混合物の <sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR の測定 (Fig. 4) とそれらをトリメチルシリル化して個々の構成単糖をガスクロマトグラフィーにより分析した。加水分解して得られた単糖混合物の NMR (Fig. 4) からは通常の六単糖のシグナルに加え 1.07 ppm と 1.03 ppm にダブルット (J=6.5 Hz) のメチル基 (<sup>13</sup>C NMR では 15.1

ppm) のシグナルが見られる事からデオキシ糖の存在が示唆される。トリメチルシリル化物のガスクロマトグラフィーを標品の糖のトリメチルシリル化物とのリテンションタイムの比較によりマンノース、グルコース、ガラクトースに加えデオキシ糖であるラムノースさらに五単糖であるアラビノ

ース、キシロースが検出された。これらの単糖の構成比を Table 1 に示す。

麹菌は大豆細胞壁の多糖類を低分子可溶化する。今回イムバランスの多糖類を加水分解してアラビノースとガラクトースおよびキシロースが主成分で得られた。これは

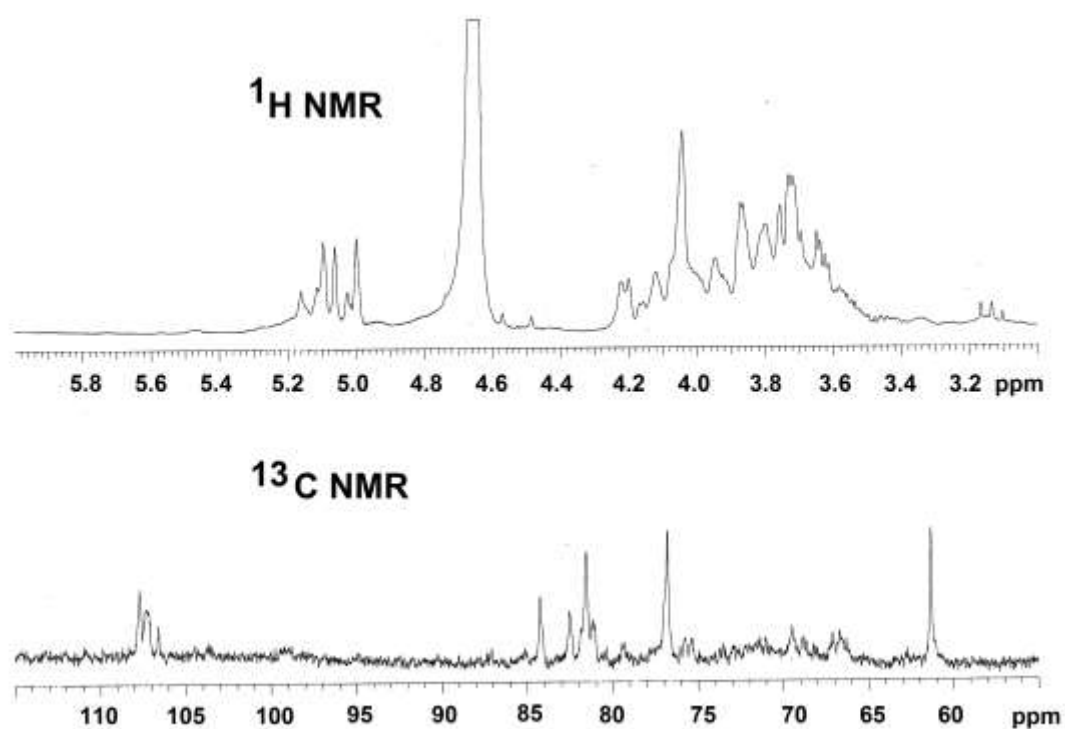


Fig. 3. イムバランス多糖類 (Fr, 1) の  $^1\text{H}$  NMR および  $^{13}\text{C}$  NMR (重水中)。

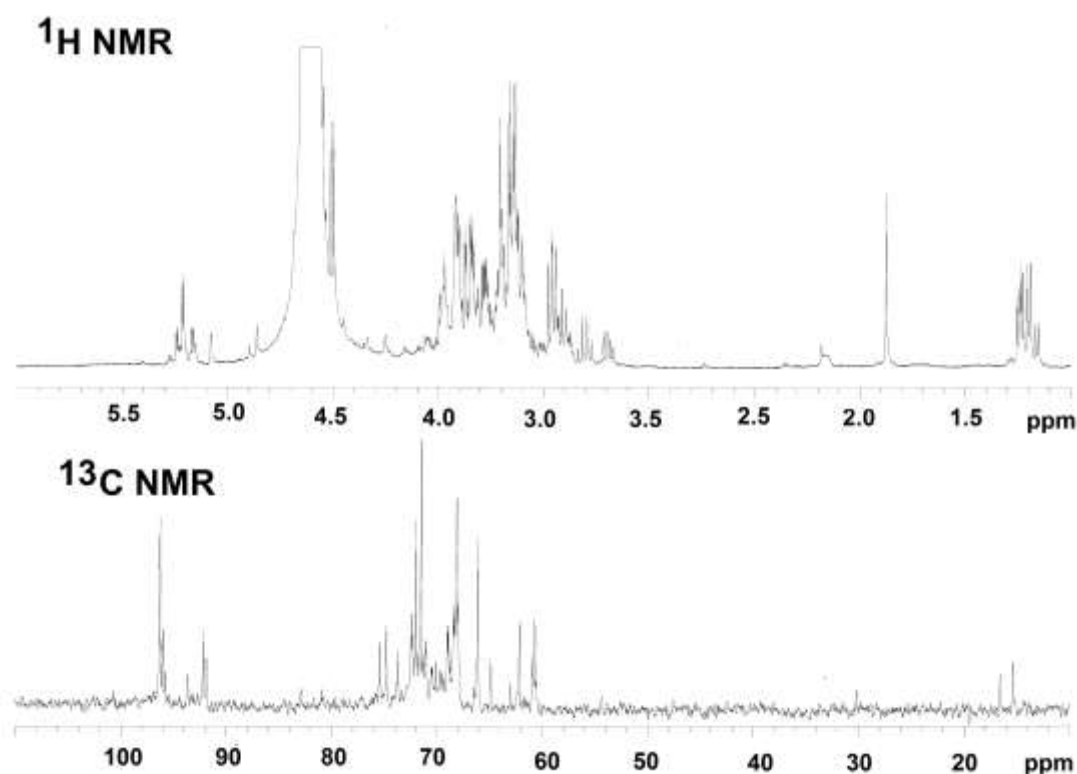


Fig. 4 イムバランスの多糖を加水分解して得られる単糖類混合物の重水中の $^1\text{H}$ -NMR（上段）と $^{13}\text{C}$ -NMR（下段）。

大豆細胞壁を構成する主多糖類であるアラビノガラクトタンとアラビノキシランに由来すると考えられる<sup>8)</sup>。リボースとマンノースについても菊池らは濃縮大豆を原料とした水溶性多糖の構成成分にその存在を報告している<sup>9,10)</sup>。これらの事からイムバランスの多糖類はダイズ細胞壁の不溶性多糖を麹菌が低分子化して可溶化したもの、すなわち醤油多糖(sps: Shoyu polysaccharides) 類似の物質であると考えられる。

また乳酸菌 (*Enterococcus faecium* および *Pediococcus parvulus*) は菌体外に水溶性多糖類を分泌する事が知られている<sup>11)</sup>。これら乳酸菌の分泌する多糖類はグルコースを構成糖とすることが知られている<sup>12)</sup>。Table 1 に示したように Fr. 1 の多糖類の加水分解物にはグルコースも少量 (1.5%) 含まれ

ている。従ってイムバランスに含まれる多糖類には乳酸菌由来の成分も含まれると考えられる。

なお菊池らは大豆の蒸煮によって抽出される酸性多糖類の構成成分としてデオキシ糖であるラムノースを報告している<sup>8)</sup>。今回われわれも Fr. 1 の多糖類の加水分解物にラムノースが 7.6%含まれていることを確認した。

Table 1 イムバランスの多糖を加水分解して得られる単糖とその量比(%).

単糖	含量 %
ラムノース	7.6
リボース	3.6
フコース	7.4
アラビノース	41.4
キシロース	10.4
フルクトース	±
マンノース	4.0
グルコース	1.5
ガラクトース	23.7

から直接多量に摂取することは含まれる塩分の関係で難しい。醤油多糖類は醤油にエタノールを混合することにより沈殿物や醤油を透析処理したあとの非透析物として得ることができるが調整する事が大変である。従ってイムバランスは醤油多糖類似物質および乳酸菌由来の多糖が含まれることから有効な機能性素材である。

日本の伝統的な麹菌発酵技術に基づいて作られた機能性麹菌発酵食品は、乳酸菌のプロバイオティクスより顕著な効果が確認され<sup>3)</sup>、日本特有の麹プロバイオティクスである。

#### 4. 結論

麹菌発酵大豆培養物（イムバランス）のアレルギー反応の抑制活性物質を Th2 サイトカイン産生の抑制作用を指標として検討した。その結果、分子量 10,000 程度の水溶性多糖類画分に強い活性が認められた。この画分の構造を NMR および糖の加水分解などで検討した結果、この多糖類は大豆細胞壁の不溶性多糖を麹菌が低分子可溶化したもの、すなわち醤油多糖（アラビノガラクトタンとアラビノキシラン）と類似の物質であると考えられる。また乳酸菌（*Enterococcus faecium* および *Pediococcus parvulus*）の水溶性多糖類も含まれていると考えられる。この多糖類は醤油多糖と異なり、我々の独自の特許製法（日本特許：2696057 号、3014145 号、US Patent No.: 5885632、EP 0682877）で製造したものであり、麹多糖 (koji polysaccharides) と命名した。

醤油多糖は免疫賦活作用やアレルギー抑制などの効果が知られている<sup>13-15)</sup> が醤油

引用文献

- 1) 平成 15 年厚生労働省の保険福祉動向調査, 2003 年 6 月.
- 2) Matsuda, A., Tanaka, A., Pan, W., Okamoto, N., Oida, K., Kingyo, N., Amagai, Y., Xia, Y., Jang, H., Nishikawa, S., Kajiwara, N., Ahn, G., Ohmori, K., Matsuda, H.: Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J. Dermatol. Sci.*, **67**, 130–139, (2012).
- 3) Zhang, T., Pan, W., Takebez, M., Schofield, B., Sampson, H., Li, X.M.: Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. *Clin. Exp. Allergy*, **38**, 1808–1818 (2008).
- 4) Otsuka, Y., Pan, W.: Effects of the novel symbiotic ImmuBalance as a food supplement in relieving clinical symptoms of Japanese cedar pollinosis: A pilot study. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, **34**, S73–5 (2007).
- 5) 潘 偉軍. 新しい発酵食品 (イムバランス)における食物アレルギー反応の抑制効果. *アレルギーの臨床*, **27**, 69-74 (2007).
- 6) 田島巖、中川朋子、杉浦至郎、榎村春江、中西里映子、漢人直之、重廣宗一郎、潘偉軍、伊藤浩明. 麹菌発行大豆培養物 (イムバランス)が小児アトピー性皮膚炎に与える影響. *アレルギーの臨床*, **36**, 55-59 (2016).
- 7) Kay, J., Porcelli, S., Tite, J., Jones, B., Janeway, CA.: Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells. *J Exp Med.*, **158**, 836-856 (1983).
- 8) 菊池忠昭、農化、大豆の蒸煮により抽出される多糖類について、**46**, 405-409 (1972).
- 9) 菊池忠昭 農化、大豆細胞壁多糖類の醤油醸造における変化、**50**, 273-277 (1976).
- 10) Kikuchi, T. and Sugimoto, H.: Detailed structure of an acidic polysaccharide in soy sauce, confirmed by use of two kinds of purified pectinase. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 87-92 (1976).
- 11) Wang, Y., Huebner, J., Tzianabos, A.O., Martirosian, G., Kasper, D.L., Pier, G. B.: Structure of an antigenic teichoic acid shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *Carbohydr. Res.*, **316**, 155–160 (1999).
- 12) Maria C. Manca de Nadra, Ana M. Strasser de Saad, Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int. J. Food Microbiol.*, **27**, 101-106 (1995).
- 13) Matsushita, H., Kobayashi, M., Tsukiyama, R., Fujimoto, M., Suzuki, M., Tsuji, K., Yamamoto, K.: Stimulatory effect of Shoyu polysaccharides from soy sauce on the intestinal immune system, *Int. J Mol. Med.* **22**, 243-247 (2008).
- 14) 真岸範浩、松下裕昭、古林万木夫、醤油から生まれた機能性成分 SPS、*生物学*、**87**, 34-35 (2009).
- 15) Kobayashi, M., Matsushita, H., Yoshida, K., Tsukiyama, R., Sugiyama, T., Yamamoto, K.: In vitro and in vivo anti-allergic activity of soy sauce. *Int. J Mol. Med.*, **14**, 879-884 (2004).



Article

**Inhibitory effects of fermented soybean culture (ImmuBalance®) and that activity component on T-helper type 2 responses**

Takashi Maoka\*<sup>1</sup>, Naomi Yasui<sup>2</sup>, Hiroko Negishi<sup>2</sup>, Katsumi Ikeda<sup>2</sup>, Tomohiro Amami<sup>3</sup>

1) Research Institute for Production Development, 15 Shimogamo-morimoto-cho Sakyo-ku, Kyoto, 606-0805, Japan

2) School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Mukogawa Women's University, 11-68, Koshien-9-bancho, Nishinomiya 663-8179, Japan

3) Nichimo Biotics Co.Ltd., 2-2-20, Higashishinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002, Japan

Received March 30, 2017; Accepted May 9, 2017

ImmuBalance® is a fermentation product of a defatted soybean with koji fungus (*Aspergillus oryzae*) and lactic acid bacterium (*Enterococcus faecium* and *Pediococcus parvulus*). The active compound of ImmuBalance® was screened with down-regulation of Th2 responses assay. As the result, macromolecule fraction having molecular weight about 10,000 showed strong activity. The structure of this compound was determined as polysaccharides by NMR. Hydrolysis experiment showed that this polysaccharide was mainly consisted with arabinose (41.4 %), galactose (23.7 %), and xylose (10.4 %). The results indicated that this polysaccharide was resembled to soy sauce polysaccharides (arabinogalactan and arabino xylan). Furthermore, rhamnose, ribose, fucose, mannose and glucose were identified as minor components. These sugars might be derived from polysaccharides produced by lactic acid bacterium (*Enterococcus faecium* and *Pediococcus parvulus*). Therefore, the activity compound of ImmuBalance® was called as koji polysaccharides. Koji polysaccharides protect against allergic reaction that protection was associated with down-regulation of Th2 responses

**Key Words**

ImmuBalance®, koji fungus, koji polysaccharides, Th2 response down-regulation

(責任編集委員：石寫純男)