

腫瘍移植マウスにおける黒酢の抗腫瘍および免疫賦活作用

上野知子, 藤井 暁, 長野正信, 侯 徳興*, 藤井 信*[§]

坂元醸造株式会社

* 鹿児島大学農学部生物資源化学科

Antitumor and Immunostimulation Effects of *Kurozu* in Tumor-bearing Mice

Tomoko Ueno, Akira Fujii, Masanobu Nagano, De-Xing Hou* and Makoto Fujii*[§]

Sakamoto Kurozu, Inc., 21-15, Uenosono-cho, Kagoshima 890-0052

* Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890-0065

Kurozu is brewed rice vinegar which has been traditionally produced in Kagoshima prefecture, Japan. When *Kurozu* which was concentrated by decompression and whose acetic acid was removed are orally administered to mice for 21 days, their splenic natural killer (NK) activity was significantly enhanced. This concentrated *Kurozu* was subjected to Sephadex G-25 gel filtration to obtain 4 fractions. The 1st fraction having the largest molecular weight (hereinafter, Fractionated-*Kurozu*) has much sugar and the main components of the sugar were mannose and glucose. After sarcoma-180-bearing mice were orally administered fractionated-*Kurozu* for 16 days, the enhancement of the tumor was suppressed. On 3 days after inoculation, the NK activity and cytokine productions were significantly enhanced by feeding them the fractionated-*Kurozu*. These results suggested that *Kurozu* had antitumor activity and that the antitumor mechanism might be related to immunostimulation activities through the increase of NK activity and cytokine productions.

(Received May 11, 2010 ; Accepted Jul. 5, 2010)

Keywords : *Kurozu*, vinegar, natural killer (NK), tumor-bearing mice, sarcoma-180

キーワード : 黒酢, 酢, ナチュラルキラー, 腫瘍移植マウス, サルコーマ 180

黒酢は鹿児島で伝統的に造られてきた食酢であり、健康食品として古くから親しまれてきた。これまでに、脂質代謝改善作用¹⁾²⁾、高血圧抑制作用³⁾、糖代謝改善作用⁴⁾、肝機能改善作用⁵⁾など多くの機能が報告されてきた。黒酢の発酵過程は非常に珍しく、世界でも類を見ない方法で製造されている。原料は、蒸し米、米麴、水のみであり、これらを陶器の壺に入れ一年以上の期間をかけて造られる。糖化、アルコール発酵、酢酸発酵、熟成の過程は、すべて一つの陶器の壺の中で進む。この発酵、熟成の過程には、麴菌、酵母、乳酸菌、酢酸菌といった様々な微生物が関与していることが報告されている^{6)~8)}。多くの微生物は、多糖類を産生し、細胞壁成分として多糖類や糖たんぱく質などを含むことが知られており^{9)~13)}、微生物、きのこ類由来の多糖類の抗腫瘍作用、免疫賦活作用に関する報告が数多く存在する^{14)~16)}。黒酢の主成分は酢酸であるが、その他の成分として有機酸、ペプチド、アミノ酸、多糖類などが含まれている。

抗腫瘍作用、免疫賦活作用に関わる細胞としてナチュラルキラー (NK) 細胞が知られている。NK 細胞は先天免疫の主要因子として働く細胞傷害性リンパ球であり、特に腫瘍細胞やウイルス感染細胞の拒絶に重要である。T 細胞とは異なり、細胞傷害性を発揮するための事前感作が必要ない^{17)~19)}。ゆえに、NK 細胞は初期の生体防御に必要不可欠であると考えられる。日常的にこの NK 細胞活性を高めることが免疫力の向上につながると考えられている。

本研究は、黒酢の抗腫瘍効果および免疫賦活作用を明らかにすることを目的とした。はじめに、正常マウスに黒酢を摂取させその NK 細胞活性を測定した。次に、黒酢を分画して得た画分を腫瘍移植マウスに摂取させ、抗腫瘍作用、免疫賦活作用を検討した。その結果、黒酢の抗腫瘍作用および免疫賦活作用について非常に興味深い知見を得たので報告する。

実験方法

1. 原材料および細胞培養

黒酢は坂元醸造(株)製(鹿児島)を用いた。OptiPrep™ は AXIS-SHIELD 社製(ノルウェー)を用いた。CytoTox

〒890-0052 鹿児島県鹿児島市上之園町 21 番地 15

* 〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1 丁目 21 番 24 号

[§] 連絡先 (Corresponding author), mfujii@ms.kagoshima-u.ac.jp

96[®] non-radioactive cytotoxicity assay kit は Promega 社製 (アメリカ) を用いた。Mouse ELISA kit は Invitrogen 社製 (アメリカ) を用いた。マウスリンパ腫 YAC-1 細胞およびマウス肉腫 sarcoma-180 (S-180) 細胞は、東北大学加齢医学研究所 (宮城) より入手した。YAC-1 細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン (PSG) 添加 RPMI 1680 培地で、37°C, 5% CO₂ 下で培養した。S-180 細胞は、BALB/c マウスの腹腔内で増殖させ 2 週間後に腹水ごと採取し、低張液内で赤血球をバースト後遠心にかけ、S-180 細胞を得た。

2. 黒酢および分画黒酢の調製

黒酢 (1000 ml) はロータリーエバポレーター (東京理化学器械 (株), 東京) にて減圧下で濃縮後、少量の水を加えながら繰り返し濃縮し酢酸を除去した。1N の NaOH を用いて pH を 7.0 に調整し、100 ml にメスアップしたものを 10 倍濃縮黒酢とした。この 10 倍濃縮黒酢を遠心し (1000 rpm, 4°C, 20 分) 上清を得て、この上清 17 ml を Sephadex G-25 ゲルに供し、4 つの画分を得た。このうち一つ目の画分を回収し 17 ml になるように濃縮した。これを分画黒酢とした。

3. 全糖量および単糖分析

10 倍濃縮黒酢を Sephadex G-25 にてゲルろ過後、フェノール硫酸法を用いて全糖量を測定した。このとき、グルコースを用いて検量線を作成した。また、分画黒酢は 1N HCl を加えて 120°C, 4 時間加水分解を行った後、イオンクロマトグラフィシステム ICS-3000 (DIONEX, アメリカ) を用いて単糖組成分析を行った。ウロン酸の分析はカルバゾール法を用い、グルクロン酸当量で示した。

4. 動物実験

BALB/c マウス (5 週令, オス) は日本 SLC (静岡) より入手し、24±2°C, 12 時間の明暗サイクル下 (午前 7 時～午後 7 時) で飼育した。飼料、水は自由摂取とした。本動物実験は、鹿児島大学実験動物倫理委員会の承認を受け、「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省) および、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学会議) を遵守した上で行った。

試験 I では、酢酸を除去した黒酢の NK 細胞活性を正常マウスを用いて検討した。マウスは 3 群に分け ($n=6$)、通常飼料、0.16% 10 倍濃縮黒酢含有飼料、または 0.32% 10 倍濃縮黒酢含有飼料のいずれかを 21 日間与えた。飼料基本組成を Table 1 に示す。飼料基本組成は AIN-93G に準拠しており、本研究で用いたすべての飼料はこの基本飼料に試験サンプルを各濃度添加して作製した。黒酢中の不揮発性有機酸の組成はこれまでに報告されている²⁰⁾。本研究では有機酸以外の不揮発性物質の作用を示すために、3 飼料の有機酸量を同等にすることとした。よって、0.32% 10 倍黒酢含有飼料の有機酸量を基準とし、通常飼料および 0.16% 10 倍黒酢含有飼料には市販の有機酸標準品を添加

Table 1 Composition of the control diet

Ingredients (g/kg diet)	
Casein	250
Corn starch	508
Sucrose	50
Cellulose	50
Corn oil	60
Vitamin mix (AIN-93)	20
Mineral mix (AIN-93)	60
Choline bitartrate	2

して調製した (乳酸: 65.8 mg/kg 飼料, ピログルタミン酸: 20.7 mg/kg 飼料, コハク酸: 4.6 mg/kg 飼料, グルコン酸: 3.3 mg/kg 飼料, クエン酸: 1.9 mg/kg 飼料, 蟻酸: 0.8 mg/kg 飼料, リンゴ酸: 0.5 mg/kg 飼料)。飼育終了後、エーテル麻酔下でと殺し脾臓を摘出後、脾臓細胞を調製し NK 細胞活性を測定した。

試験 II では、分画黒酢の抗腫瘍作用について腫瘍移植マウスを用いて検討した。エーテル麻酔下でマウス左足付け根皮下に S-180 懸濁液を 0.2 ml (5×10^5 cells in PBS) 注入後、3 群 ($n=8$) に分けた。通常飼料、1.7% 10 倍濃縮黒酢含有飼料または 1.7% 分画黒酢含有飼料のいずれかを与え 16 日間飼育した。飼育終了後、エーテル麻酔下でと殺し腫瘍を摘出後、重量を測定した。

試験 III では、分画黒酢の NK 細胞活性とサイトカイン分泌促進能について腫瘍移植マウスを用いて検討した。予備試験において、腫瘍移植マウスの脾臓細胞からのサイトカイン分泌量は、腫瘍移植後 3-4 日目で最大となることが分かったため、本試験では、腫瘍移植後 3 日目の脾臓細胞で NK 細胞活性、サイトカイン分泌能を測定した。エーテル麻酔下でマウス左足付け根皮下に S-180 懸濁液を 0.2 ml (5×10^5 cells in PBS) 注入後、2 群 ($n=3$) に分けた。また対照として、腫瘍を移植しない正常マウスも用いた ($n=3$)。腫瘍を移植しない正常マウスには、0.2 ml PBS のみ注入した。腫瘍移植マウスに通常飼料、または 1.7% 分画黒酢含有飼料のいずれかと与え、正常マウスには通常飼料を与え 3 日間飼育した。飼育終了後、エーテル麻酔下でと殺し脾臓を摘出後、脾臓細胞を調製し NK 細胞活性、サイトカイン分泌量を測定した。

5. 脾臓細胞の調製

マウスより摘出した脾臓は、RPMI 1640 培地で洗浄しピンセットで組織をしごいて細胞を取り出し、Tris-HCl バッファーを用いて赤血球を破壊した。OptiPrep[™] を用いた密度勾配遠心法により脾臓細胞を分離し、細胞生存率をトリパンブルー染色法にて測定した。このとき、細胞生存率が 90% 以上であることを確認した。NK 細胞活性測定用として、 1×10^7 cells/ml 細胞浮遊液 (5% FBS, 1% PSG 添加 RPMI 1640 培地)、サイトカイン分泌測定用として 3

×10⁶ cells/ml 細胞浮遊液 (10% FBS, 1% PSG 添加 RPMI 1640 培地) を調製した。

6. 標的細胞の調製

YAC-1 細胞は, 10% FBS 添加 RPMI 培地にて培養, 週に 2 回のペースで継代した。

7. NK 細胞活性の測定

脾臓細胞は 5. のとおりに調製し攻撃細胞 (Effector cells) として用いた。YAC-1 細胞は NK 細胞感受性の高いマウスリンパ腫として知られており標的細胞 (Target cells) として用いた。両細胞を, 5% FBS, 1% PSG 添加 RPMI 1640 培地に浮遊し, 96 ウェル丸底プレートに添加後 (1 検体より 3 ウェル), 8 時間培養した。NK 細胞活性はラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) 法を用いて測定した。LDH は通常細胞内に存在しているが, 攻撃細胞とともに培養され破壊されることで標的細胞から培地中に放出される。この細胞内量および放出量を測定することで NK 細胞活性を測定することができる。

培地中に放出された LDH は CytoTox96[®] キットを用いて測定した (E : T ratio = 25 : 1 ~ 100 : 1)。

8. サイトカイン産生量の測定

脾臓細胞は 5. のとおりに調製し, 10% FBS, 1% PSG 添加 RPMI 1640 培地に浮遊し, 12 ウェル平底プレートに添加後 (1 検体より 3 ウェル), 72 時間培養した。各ウェルより上清を集め, マウス ELISA キットを用いて IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-12 を測定した。

9. 統計解析

各実験の結果は, 平均値±標準誤差で示した。統計処理は *t* 検定もしくは Tukey の多重検定を用いた。

実験結果および考察

1. 正常マウスにおける黒酢の NK 細胞活性亢進能

通常飼料, 0.16% 10 倍濃縮黒酢含有飼料, または 0.32% 10 倍濃縮黒酢含有飼料のいずれかを正常マウスに 21 日間与えたところ, 0.32% 10 倍濃縮黒酢含有飼料を摂取した正常マウスの NK 細胞活性 (23.20±6.11%) は通常飼料摂取マウスの NK 細胞活性 (12.27±2.19%) に比べて有意に亢進した (Fig. 1)。NK 細胞活性は黒酢 10 倍濃縮液濃度依存的に亢進していたこと, 黒酢 10 倍濃縮液調製の際に揮発性物質 (酢酸) は除去していたこと, また各群の有機酸量は等しくなるよう調製していたことから, 黒酢の NK 細胞活性亢進能は有機酸以外の不揮発性物質に依存していることが示唆された。

2. Sephadex G-25 ゲルろ過による黒酢の分画

10 倍濃縮黒酢は Sephadex G-25 カラムに供し, 4 つ (I ~ IV) に分画した (Fig. 2)。フェノール硫酸法により全糖量を測定したところ, 画分 I に多くの糖が含まれていた (0.30 mg/ml)。さらにこの画分 I の単糖組成を分析したところ, マンノース, グルコース, ウロン酸, ガラクトース,

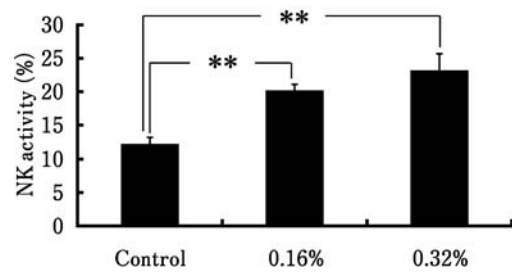


Fig. 1 Change of NK activity on mice splenocytes by oral administration of *Kurozu*

Control diet or *Kurozu* diet (0.16% or 0.32% ten-fold concentrated *Kurozu* in control diet) was fed to BALB/c mice for 21 days. NK activity was measured as described in Methods. Data represent the mean±S.E. and analyzed by ANOVA, followed by Tukey's *t*-test. ** Significant *p* < 0.01 compared with the control.

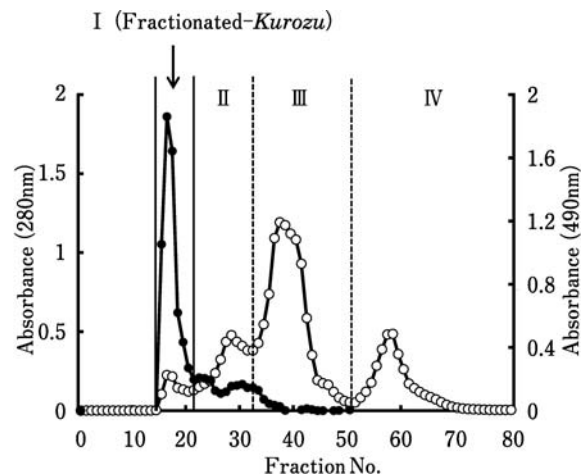


Fig. 2 Sephadex G-25 gel filtration of ten-fold concentrated *Kurozu*

Ten-fold concentrated *Kurozu* was subjected to Sephadex G-25 gel filtration. Sugar content was determined by phenol-sulfuric methods and assayed at 490 nm, using glucose as a standard. Column size, 5×60 cm; flow rate, 3 ml/min; fraction volume, 30 ml. ○, Absorbance at 280 nm; ●, Absorbance at 490 nm.

アラビノース, ラムノース, キシロースの順に含まれていた (Table 2)。その組成は抗腫瘍作用を有するコフキサリノコシカケの多糖類²¹⁾と類似していた。また, 酢酸菌がつくり出す水溶性の β グルカンが抗腫瘍作用を有するとの報告もある²²⁾。このことから, 黒酢は抗腫瘍作用を有する可能性, 特にその作用は多糖類に依存する可能性が考えられた。よって, 以下の実験はこの多糖類を多く含む画分 I (分画黒酢) に着目し進めていくこととした。

3. 腫瘍移植マウスにおける黒酢, 分画黒酢の抗腫瘍作用

黒酢, 分画黒酢の抗腫瘍作用を検討するために, S-180 細胞を移植したマウスに 10 倍濃縮黒酢又は分画黒酢 (各 1.7%) を含んだ飼料を 16 日間与えたところ, 10 倍濃縮黒

Table 2 Analysis of sugar composition

Sugar	Composition (%)
Arabinose	2.42
Galactose	8.9
Glucose	25.61
Mannose	49.36
Rhamnose	1.4
Xylose	1.29
Uronic acid	11.05

Fractionated-*Kurozu* was hydrolyzed with 1N HCl at 120°C for 4h, and the sugar composition was analyzed by ion chromatography system.

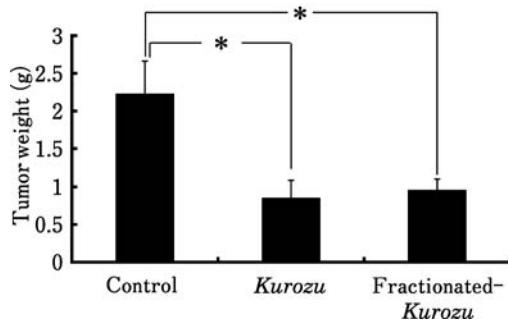


Fig. 3 Suppressing effect of *Kurozu* or fractionated-*Kurozu* on tumor growth

Control diet or *Kurozu* diet (1.7% ten-fold concentrated *Kurozu* in control diet or 1.7% fractionated-*Kurozu* in control diet) was fed to tumor-bearing BALB/c mice for 16 days. Tumor weights were measured as described in Methods. Data represent the mean \pm S.E. and analyzed by ANOVA, followed by Tukey's *t*-test. *Significant $p < 0.05$ compared with the control.

酢含有飼料又は分画黒酢含有飼料を摂取したマウスの腫瘍の成長は、通常飼料を摂取したマウスより抑制された (Fig. 3). 10 倍濃縮黒酢摂取群と分画黒酢摂取群の腫瘍成長は同程度抑制されたことから、黒酢の抗腫瘍成分の多くはこの分画黒酢に含まれていると考えられた.

4. 腫瘍移植マウスにおける分画黒酢のNK細胞活性亢進能およびサイトカイン分泌促進能

分画黒酢のNK細胞活性亢進能およびサイトカイン分泌促進能を検討するために、S-180細胞を移植したマウスに1.7%分画黒酢含有飼料を3日間与えた。また通常飼料を与えた正常マウスについても検討した。飼育3日目にNK細胞活性を測定したところ、通常飼料摂取腫瘍移植マウスのNK細胞活性は、通常飼料摂取正常マウスのNK細胞活性より低下していたが、分画黒酢含有飼料摂取腫瘍移植マウスのNK細胞活性は通常飼料摂取正常マウスのNK細胞活性より著しく上昇していた (Fig. 4). よって分画黒酢はNK細胞活性亢進能を有していることが明らかとなり、NK細胞を活性化することで腫瘍成長を抑制している

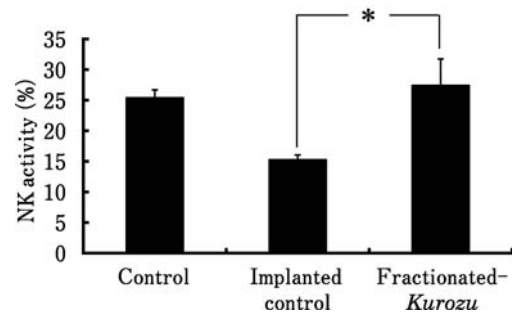


Fig. 4 Accelerating effect of fractionated-*Kurozu* on NK activity in sarcoma-180-bearing mice

Control diet or 1.7% fractionated-*Kurozu* in control diet was fed to non-tumor-bearing BALB/c mice or tumor-bearing BALB/c mice for 3 days. NK activity was measured as described in Methods. Control; non-tumor-bearing mice fed without fractionated-*Kurozu*, Implanted control; tumor-bearing mice fed without fractionated-*Kurozu*, Fractionated-*Kurozu*; tumor-bearing mice fed with fractionated-*Kurozu*. Data represent the mean \pm S.E. and analyzed by Student's *t*-test. *Significant $p < 0.05$ compared with the implanted control.

ことが示唆された。また、飼育3日後のマウスから取り出した脾臓より脾臓細胞を調製し72時間培養後、その培地中に放出されたサイトカイン量を測定したところ、分画黒酢含有飼料摂取腫瘍移植マウスの脾臓細胞より放出されたIFN- γ 量 (587.56 ± 177.72 pg/ml)は、通常飼料摂取腫瘍移植マウスのIFN- γ 量 (49.58 ± 14.34 pg/ml)に比べて著しく増加した (Fig. 5). 腫瘍の移植のみでは、IFN- γ 分泌は著しく誘導されないが、分画黒酢を摂取させることで産生量を大幅に増加させられることが明らかとなった。TNF- α 産生に関しては、分画黒酢含有飼料摂取腫瘍移植マウスでは 376.01 ± 64.91 pg/ml 分泌されており、通常飼料摂取腫瘍移植マウスでは 112.19 ± 44.06 pg/ml 分泌されていた。IL-12産生に関しては、分画黒酢含有飼料摂取腫瘍移植マウスでは 118.36 ± 6.39 pg/ml 分泌されており、通常飼料摂取腫瘍移植マウスでは 78.86 ± 4.73 pg/ml 分泌されていた。このことから、分画黒酢を摂取することで、TNF- α およびIL-12産生が増大することが明らかとなった。IL-2産生に関しては、分画黒酢含有飼料摂取腫瘍移植マウスにおいて通常飼料摂取腫瘍移植マウスに比べてわずかな産生の増大が見られたが有意な差は得られなかった (データ省略)。また、IL-1 β 産生についても、各群間での差は見られなかった (データ省略)。IL-12は、免疫応答反応の初期段階において、マクロファージのような抗原提示細胞より産生される²³⁾。さらにこのIL-12はNK細胞を活性化することで腫瘍増大を抑制することが知られている。マクロファージは活性化したNK細胞より分泌されるIFN- γ によりさらに活性化し、TNF- α を産生することで腫瘍を攻撃する²⁴⁾²⁵⁾。分画黒酢はIL-12やIFN- γ 、TNF- α などのサイ

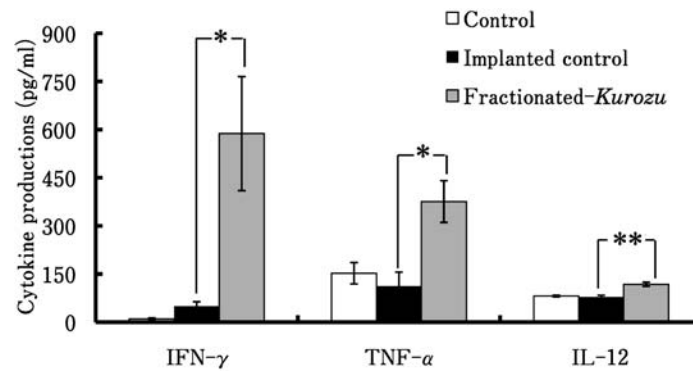


Fig. 5 Change of the cytokine production by oral administration of fractionated-Kurozu

Control diet or 1.7% fractionated-Kurozu in control diet was fed to non-tumor-bearing BALB/c mice or tumor-bearing BALB/c mice for 3 days. Cytokine concentrations were measured as described in Methods. Data represent the mean \pm S.E. and analyzed by Student's *t*-test. *Significant $p < 0.05$, **Significant $p < 0.01$ compared with the implanted control.

トカイン産生を増大させることが明らかとなり、分画黒酢の抗腫瘍作用はこれらのサイトカインが関わる免疫応答反応の初期段階を活性化させることにより発揮されると考えられた。NK 細胞活性は、分画黒酢含有飼料摂取腫瘍移植マウスにおいて通常飼料摂取腫瘍移植マウスに比べ飼育 3 日目に著しく増加した。NK 細胞活性は感染初期に著しく亢進することが知られており、その後活性は緩やかに低下していく²⁶⁾。本実験でも、NK 細胞活性は長期的には維持されず、飼育 3 日目を以降には緩やかに低下し、それに合わせてサイトカイン産生も低下していった(データ省略)。このことから、分画黒酢の摂取は免疫応答反応初期段階で NK 細胞活性を急激に亢進することが明らかとなり、初期に腫瘍細胞を激しく攻撃することが、最終的な腫瘍増大の抑制につながると考えられた。これまでに、数多くの多糖類が NK 細胞活性やサイトカイン産生を亢進することが報告されてきた。カシス由来の多糖類を腫瘍移植マウスに経口投与すると、IL-2、IL-10 および IFN- γ 産生が亢進され、腫瘍増大が抑制されることが報告されている²⁷⁾。また、糖たんぱく質の免疫賦活作用に関する報告もあり、メンマコブより抽出された糖たんぱく質がマクロファージ細胞からの IL-6、TNF- α および IL-1 産生を亢進することも報告されている²⁸⁾。黒酢の発酵には多くの微生物が関与しているが、微生物の細胞壁の成分としてペプチドグリカンが知られている。細胞壁のペプチドグリカンがマウスにおいて腫瘍成長を抑制するという報告もある²⁹⁾。これらのことから、黒酢の抗腫瘍能、サイトカイン産生促進能には多糖類や糖たんぱく質が関与している可能性が考えられる。原料である米に由来する多糖としてデンプンが考えられるが、デンプンは微生物によって利用されるため、米由来の多糖そのものが黒酢中に残存している可能性は低い。ゆえに、本研究で作用を示した物質は原料由来ではなく、発酵に関わる微生物由来もしくは、微生物が産生した物質であると

考えられる。

本研究で、我々は黒酢の抗腫瘍能、NK 細胞活性亢進能、サイトカイン産生促進能について証明した。この活性成分は高分子の物質であり、多糖類である可能性が示唆される。黒酢の発酵には多くの微生物が関与しており、この微生物由来の多糖類もしくは微生物が産生する多糖類が黒酢にこのような機能を与えているのかもしれない。今後、この活性成分の特定が求められる。

要 約

黒酢は鹿児島で伝統的に作られてきた食品である。黒酢をロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し酢酸除去したものをマウスに 21 日間与えたところ、マウス脾臓より調製した NK 細胞の活性が有意に増加した。この濃縮黒酢をゲルろ過し、4 つの画分を得た。最も高分子の画分(以下、分画黒酢)に糖が多く含まれ、その多糖の主成分は多い順に、マンノース、グルコース、ウロン酸、ガラクトース、アラビノース、ラムノース、キシロースだった。黒酢または分画黒酢を S-180 移植マウスに 16 日間与えたところ、腫瘍の増大が有意に抑制された。さらに、分画黒酢を 3 日間摂取させると、S-180 移植マウスの脾臓細胞より取り出した NK 細胞の活性が有意に増加し、サイトカインの IFN- γ 、TNF- α 、IL-12 の分泌も有意に増加した。以上より、黒酢は抗腫瘍作用および免疫賦活作用を持つ食品であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 谷澤久之, 佐塚泰之, 小松(芹田)明子, 滝野吉雄, マウスにおける米酢の急性毒性と脂質代謝に及ぼす作用について, 栄食誌, **36**, 283-289 (1983).
- 2) 藤野武彦, 有吉恭子, 牧角和宏, 金谷庄蔵, 大倉洋甫, 醸造酢の人体の血中脂質, 血中レオロジーに及ぼす影響, 健康科学, **10**, 85-89 (1988).

- 3) 大南宏治, 松岡栄子, 奥田拓道, ラット (SHR) の血圧に及ぼすくろずの作用, 基礎と臨床, **19**, 237-241 (1985).
- 4) 長野正信, 藤井 暁, 青山美子, 栗田源彦, 藤井 信, くろずもろみ末および黒酢濃縮液の糖代謝への影響, 薬理と治療, **34**, 199-206 (2006).
- 5) Fujii, M., Hou, D.X., Arimura, M., Hiwata, T., Suzuki, M. and Nagano, M., Effect of *Kurozu* (Brewed Rice Vinegar) on Maintenance of Primary Culture of Rat Hepatocytes. *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 97-98 (1999).
- 6) 小泉幸道, 都築順一, 中村勇人, 柳田藤治, 壺酢製造における振り麴の役割について, 日食工誌, **35**, 670-677 (1988).
- 7) 小泉幸道, 鈴木忠邦, 中山利夫, 橋口和典, 柳田藤治, 福山米酢の仕込み時に行われる振り麴の役割について, 日食工誌, **36**, 237-244 (1989).
- 8) Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M. and Igarashi, Y., Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International journal of food microbiology*, **109**, 79-87 (2006).
- 9) Taniguchi, Y., Nishizawa, T., Kouhchi, C., Inagawa, H., Yamaguchi, T., Nagai, S., Tamura, A. and Soma, G., Identification and characterization of lipopolysaccharide in acetic acid bacteria. *Anticancer research*, **26**, 3997-4002 (2006).
- 10) Sasaki, T., Fukumi, S. and Namioka, S., Enhancement of cytotoxic activity of lymphocytes in mice by oral administration of peptidoglycan (PG) derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *The Journal of veterinary medical science*, **56**, 1129-1133 (1994).
- 11) Ito, H., Shimura, K., Itoh, H. and Kawade, M., Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer research*, **17**, 277-284 (1997).
- 12) Ooi, V.E. and Liu, F., Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry*, **7**, 715-729 (2000).
- 13) Yoon, T.J., Kim, T.J., Lee, H., Shin, K.S., Yun, Y.P., Moon, W.K., Kim, D.W. and Lee, K.H., Anti-tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. *International immunopharmacology*, **8**, 36-42 (2008).
- 14) Tsuchiya, Y., Matsutani, M., Inoue, M., Sato, S., Asano, T. and Yajima, M., Effect of a glucan, sizofiran, on natural-killer activity of 5-fluorouracil-treated murine bone marrow cells. *Cancer immunology, immunotherapy*, **34**, 17-23 (1991).
- 15) Renzo, L.D., Yefenof, E. and Klein, E., The function of human NK cells is enhanced by beta-glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *European journal of immunology*, **21**, 1755-1758 (1991).
- 16) Saito, K., Yajima, T., Nishimura, H., Aiba, K., Ishimitsu, R., Matsuguchi, T., Fushimi, T., Ohshima, Y. and Tsukamoto, Y., Soluble branched beta-(1,4)glucans from *Acetobacter* species show strong activities to induce interleukin-12 in vitro and inhibit T-helper 2 cellular response with immunoglobulin E production in vivo. *J. Biol. Chem.*, **278**, 38571-38578 (2003).
- 17) Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J. and Starkey, J.R., Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57BL/6 normal and beige mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **65**, 929-935 (1980).
- 18) Gorelik, E., Wiltrout, R.H., Okumura, K., Habu, S. and Herberman, R.B., Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *International journal of cancer*, **30**, 107-112 (1982).
- 19) Lala, P.K., Stanter, V., Libenson, H. and Parhar, S., Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. I. Kinetics and in vivo significance. *Cellular immunology*, **93**, 250-264 (1985).
- 20) 水元弘二, 橋口和典, 市販米酢の品質について (第三報), 鹿児島工業技術センター研究報告, **2**, 27-33 (1988).
- 21) Yong, T.J., Byung, K.Y., Sang, C.J., Sang, M.K. and Chi, H.S., *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. *Phytotherapy research*, **22**, 614-619 (2008).
- 22) Kamiryo, Y., Yajima, T., Saito, K., Nishimura, H., Fushimi, T., Ohshima, Y., Tsukamoto, Y., Naito, S. and Yoshikai, Y., Soluble branched (1,4)-beta-D-glucans from *Acetobacter* species enhance antitumor activities against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response. *International journal of cancer*, **115**, 769-776 (2005).
- 23) Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F. and Gately, M.K., Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**, 1223-1230 (1993).
- 24) Divino, C.M., Chen, S.H., Yang, W., Thung, S., Brower, S. T. and Woo, S.L., Anti-tumor immunity induced by interleukin-12 gene therapy in a metastatic model of breast cancer is mediated by natural killer cells. *Breast cancer research and treatment*, **60**, 129-134 (2000).
- 25) Parihar, R., Dierksheide, J., Hu, Y. and Carson, W.E., IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *The Journal of clinical investigation*, **110**, 983-992 (2002).
- 26) 笹月健彦, 「免疫生物学」, 第3版 (南江堂, 東京), pp. 365-367 (1998).
- 27) Takata, R., Yamamoto, R., Yanai, T., Konno, T. and Okubo, T., Immunostimulatory effects of a polysaccharide-rich substance with antitumor activity isolated from black currant (*Ribes nigrum* L.). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 2042-2050 (2005).
- 28) Kim, G.Y., Lee, J.Y., Lee, J.O., Ryu, C.H., Choi, B.T., Jeong, Y.K., Lee, K.W., Jeong, S.C. and Choi, Y.H., Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 1218-1226 (2006).
- 29) Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T. and Hashimoto, Y., A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Research*, **45**, 1300-1307 (1985).

(平成 22 年 5 月 11 日受付, 平成 22 年 7 月 5 日受理)