

信州伝統野菜「野沢菜」によるウイルス感染症予防効果の検証

信州大学 農学部
田中 沙智

1. 研究の背景と目的

感染症はウイルスや細菌などの病原体が体内に侵入して増殖し、発熱や下痢などの諸症状を伴う病気である。特に免疫機能が低下している乳児や高齢者においては、感染症が致死的な状況を引き起こすこともあるため、免疫機能を適切に維持して感染症を予防することが重要である。ウイルス感染症を未然に防ぐためには、ウイルスを体の中に入ること防ぐだけでなく、体内に侵入した際に迅速にウイルスを攻撃し、排除するための免疫体質をつくることが重要である。

免疫関連疾患を予防するためには、日々の食事で免疫力を高める食材を積極的に摂取することが重要であると考えた。免疫調節作用をもつ食品由来成分の代表として乳酸菌がよく知られており、炎症性腸疾患の制御、感染症の抑制効果、アレルギー改善効果があることが知られている^[1]。乳酸菌は、抗ウイルス免疫に対しても影響を与えることが報告されており、*Lactococcus lactis* JCM5805 株の経口投与により、パラインフルエンザウイルス感染に対して、肺の免疫反応や感染抵抗力を増強させることが示されている^[2]。加えて、*L. lactis* JCM5805 株は pDC における TLR9 を介して I 型 IFN を産生誘導することが示されている^[3]。*L. lactis* 株に関する研究では、形質様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells : pDC) を活性化させることにより抗ウイルス物質の産生を増加させることで、デングウイルス感染に対して抗ウイルス効果を有することが示されている^[4]。

当研究室では、信州の伝統野菜である野沢菜に着目して研究を進めている。野沢菜は、アブラナ科アブラナ属の二年生の植物であり、食物繊維やビタミン C が豊富である。長野県を中心に栽培されており、野沢菜の利用法としては、野沢菜漬けが一般的である。野沢菜を漬けることで、乳酸菌のはたらきにより乳酸発酵が進み、うま味や酸味が増すとされている^[5]。先行研究において、野沢菜を熱水抽出して得られる不溶性画分で樹状細胞を刺激したところ、IL-12 の産生を誘導し、産生された IL-12 が NK1.1 陽性細胞からの IFN- γ 産生を誘導することが示された^[6]。マクロファージにおいても、野沢菜不溶性画分は RAW264 細胞およびマウスから単離した腹腔マクロファージからの TNF- γ と IL-6 産生を誘導することが示されている^[7]。野沢菜漬けも野沢菜と同様に免疫賦活効果を有することが知られている。当研究室で行われた先行研究により、野

沢菜漬けで刺激したマウス脾臓細胞では、IFN- γ および IL-10 の産生が高まることが示された^[8]。しかしながら、野沢菜の樹状細胞における IL-12 以外のサイトカイン産生への影響や、野沢菜漬けの樹状細胞における効果およびそれらのメカニズムについては未だ知られていない。

そこで本研究では、野沢菜の不溶性画分を調製し、野沢菜の活性成分による樹状細胞を介した抗ウイルス免疫賦活効果の検証、およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、野沢菜を食す際は漬物に加工することが一般的であることから、野沢菜漬けの抗ウイルス免疫賦活効果を検討するため、野沢菜漬けの不溶性画分についても検討を行った。

2. 研究方法

2-1. 野沢菜および野沢菜漬けの熱水抽出不溶性画分の調製

野沢菜を蒸留水で洗い、121℃で20分間オートクレーブをかけた。その後、サンプルをホモジナイズ (AM-3, Ace Homogenizer, Nissei, Tokyo, Japan) し、2,000 × g で10分間、遠心分離を行った。遠心後の上清を採取して20,630 × g で5分間の遠心分離を行い、ペレットを凍結乾燥 (FDU-1200 freeze dryer, Eyela, Japan) して、野沢菜不溶性画分として実験に使用した。野沢菜漬けは、20型の漬け物容器にポリ袋を広げ、軽く水洗した原料 (約5 kg) を原料の半分量の食塩水 (食塩は原料の7%重量) で塩水漬けし、上に押し蓋と漬け物石 (5.5型) を乗せ、袋の口を閉じた。容器は10℃の冷蔵庫に移して、発酵させた。漬け込み後7日後にサンプルを回収し、4~5 cm に刻んだサンプルを袋に入れて-30℃で保存した。その後、NZ IF と同様の方法で野沢菜漬け不溶性画分を調製した。

2-2. 実験動物

本実験で使用した雌の C57BL/6 マウスは、日本クレア (Tokyo, Japan) より購入した。また、雌の C57BL/6 系統の TLR2 ノックアウトおよび TLR4 ノックアウトマウスは、オリエンタル酵母工業 (Tokyo, Japan) より購入した。マウスは、室温 23 ± 2℃ で12時間ごとに明暗が切り替わる環境で飼育した。全実験は、信州大学動物実験委員会の定める指針に従って行った。

2-3. 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の誘導

骨髄細胞は、4～6週齢の雌マウスの大腿骨と脛骨から採取した。骨髄細胞 (1×10^6 cells/well) を、10% FBSと100 U/mLのペニシリンGおよび100 μ g/mLのストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2-Mercaptoethanol (2-ME, Sigma-Aldrich), GM-CSF (10 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を加えたRPMI-1640培地 (3 mL/well, Sigma-Aldrich) で37℃, 5% CO₂ インキュベータ内に6well平底プレートで培養し、BMDCを誘導した。6日間培養した後、細胞をセルスクレーパーで回収し、これをBMDCとして実験に使用した。培地交換は2日毎に2 mL/wellで行った。

誘導したBMDCを12well平底プレートに 1×10^6 cells/wellの濃度で再度播種し、一晚培養した後、野沢菜不溶性画分 (50 μ g/mL), 野沢菜漬け不溶性画分 (50 μ g/mL) を添加し、2時間刺激した時の遺伝子発現量を解析した。また、誘導したBMDCを96well平底プレートに 2.5×10^5 cells/wellの濃度で再度播種し、一晚培養した後、5, 25, 50 μ g/mLの野沢菜または野沢菜漬け不溶性画分で24時間刺激し、培養上清中に含まれるサイトカイン量を測定した。

2-4. ELISA

培養上清中のTNF- α の産生レベルの定量はELISAを用いて行った。測定には、Purified anti-mouse TNF- α Antibody, Biotin anti-mouse TNF- α Antibody, (BioLegend, San Diego, CA, USA) を使用した。測定はすべて製品が推奨するプロトコールに従って行った。

2-5. Total RNAの抽出

mRNA発現解析で使用するTRI Reagent (Molecular Research Center, Inc. OH, USA), クロロホルム, 2-プロパノール, エタノールは(富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan), RNase-free waterはSigma-Aldrich, Ethachinmate, 3M Sodium Acetateはニッポンジーン (Tokyo, Japan) より購入した。

刺激後のBMDCの培養上清をすべて除去し、1 mLのTRI Reagentを加え、細胞を1.5 mLチューブに回収した。細胞回収を行ったチューブは-80℃で一晩保存した。解凍後、チューブに200 μ Lのクロロホルムを加え、ボルテックスを用いて15秒間激しく混合した。混合溶液を室温で15分間静置し、4℃, 12,000 $\times g$ で15分間遠心した。遠心後の上清のうち、透明な水層を、イソプロパノール 500 μ L, 3M Sodium Acetate 16.5 μ L, Ethachinmate 3 μ Lが入った新しい1.5 mLチューブに分取し、転倒混和した。混合液を室温で10分間静置し、4℃, 12,000 $\times g$ で8分間遠心した。遠心後、上清を除去し、75%エタノールを1 mL加えボルテックスを用い

て混合した。4℃, 12,000 $\times g$ で5分間遠心し、エタノールを除去しTotal RNAを得た。

2-6. 逆転写 (RT) および定量PCR (qPCR) 反応

Oligo(dT)12-18 PrimerはThermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), 使用した各プライマーはすべてInvitrogen (Carlsbad, CA, USA) より、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), dNTP Mixture, PrimeScript™ II Reverse TranscriptaseはTakara (Shiga, Japan) より購入した。

RT反応では、0.2 mLチューブに1 μ LのOligo(dt)12-18 Primer, 4 μ Lの2.5 mM dNTP, 1 μ gのTotal RNAとRNase free waterを加えTotal 13 μ Lとし、サーマルサイクラーを用いて65℃, 5分間反応させた。反応後のチューブを氷上で1分間静置し、4 μ Lの5 \times PrimeScript II Buffer, 0.5 μ LのPrimeScript™ II Reverse Transcriptase, RNase Free Waterを加えTotal 20 μ Lに調製した後、サーマルサイクラーを用いて、50℃で60分間、70℃で15分間の条件で反応させてcDNAを合成した。qPCR反応では、目的とする遺伝子のForwardおよびReverseの各プライマー (10 μ M) を1 μ Lずつ、12.5 μ LのTB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), 9.5 μ LのRNase Free Waterに1 μ LのcDNAを加えTotal 25 μ Lとした後、Takara Thermal Cycler Dice® Real-time System III TP950 (Takara) を用いて行った。増幅条件は、95℃で1分間の反応の後、95℃で5秒間、60℃で30秒間の反応を40サイクル繰り返し行い、最後に融解曲線分析を95℃で15秒間、60℃で30秒間、95℃で15秒間の反応で行った。Rps18をハウスキーピング遺伝子とし、比較Ct ($\Delta\Delta$ Ct) 法を用いて相対的定量で各遺伝子の発現量を解析した。使用したプライマー配列は表1に示した。

表1. 実験に使用したプライマー

| Target gene | Sequence(5'-3') | Length(bp) |
|------------------------------|--|------------|
| Rps18 | f-AGGACCTGGAGAGGCTGA r-CAGTGGTCTTGGTGTGCT | 93 |
| IFN- β | f-ATGAACTCCACCAGCAGACAG r-ACCACCATCCAGGCGTAGC | 135 |
| TNF- α | f-GGTTCTCTTCAAGGGACAAGGCTG r-TCCTGGTATGAGATAGCAAATCGG | 81 |
| Influenza virus M protein | f-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG r-AGGGCATTITGGACAAAGCGTCTA | 245 |

2-7. インフルエンザウイルス増殖培地の作成

93 mLのD-MEM (高グルコース, L-グルタミン不含, フェノールレッド不含, 富士フィルム和光純薬株式会社) に、1 mLのペニシリンG (100 U/mL), ストレプトマイシン (100 μ g/mL), 1 mLのL-Glutamine (200 mM, Thermo), 2.5 mLのHEPES (1 M, Thermo),

225 mg の Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich) を 3 mL の D-MEM に溶解して作成した 7.5% BSA 溶液を 2.5 mL 添加して、完全ダルベッコ改変イーグル培地 (cDMEM)/7.5% BSA を作成した。この培地に終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で Trypsin, TPCK Treated (Thermo) を添加し、インフルエンザウイルス増殖培地とした。

2-8. インフルエンザウイルスの培養

国立感染症研究所 (Tokyo, Japan) から Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) の分与を受けた。インフルエンザウイルスを増殖させるために、イヌ腎尿管上皮細胞 (Madin-Darby canine kidney cell: MDCK) を使用した。MDCK の単層を形成させた細胞培養 75 cm^2 フラスコ (AS ONE, Osaka, Japan) にインフルエンザウイルスを播種し、インフルエンザウイルス増殖培地で、細胞変性効果が観察されるまで培養した。約 75% の細胞で細胞変性効果が観察されたタイミングで培養上清を回収し、300 $\times g$ で 4 分間遠心を行い、得られた上清をインフルエンザウイルスストックとした。

2-9. PCR によるウイルス量の定量

インフルエンザウイルス RNA は、NucleoSpin[®] RNA Virus (Takara) を用いて抽出した。RNA の抽出はキットに記載されたプロトコールに従って行った。A 型インフルエンザウイルスに特異的な Matrix Protein (Mタンパク質) を標的としたプライマーを作成し、One Step TB Green[®] PrimeScript[™] PLUS RT-PCR Kit (Takara) を使用して One-Step RT-qPCR を行った。One-Step RT-qPCR 反応は、キットに従ってマスターミックスを調製し、Takara Thermal Cycler Dice[®] Real-time System III TP950 を用いて行った。増幅反応は、42 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間、95 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒間の RT 反応を行った後、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間の qPCR 反応を 40 サイクル繰り返しを行い、最後に融解曲線分析を 95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間、95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間の反応で行った。遺伝子の増幅は、Ct 値および電気泳動のバンドによって確認した。使用したプライマー配列は表 1 に示した。

2-10. BMDC のインフルエンザウイルス感染

6 well 平底プレートに BMDC を 1×10^6 cells で播種し一晚培養した。野沢菜不溶性画分もしくは野沢菜漬け不溶性画分 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 2 時間の前処理を行い、作製したウイルスストックを 300 μL 添加して 1 時間ウイルスに感染させた。1 時間後に PBS で well を 3 回洗浄し、100 U/mL のペニシリン G および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシン (Sigma-Aldrich), 2-Mercaptoethanol (2-ME, Sigma-Aldrich), GM-CSF (10 ng/mL, R&D System), Trypsin, TPCK Treated (終濃度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Thermo) を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich)

を 2 mL 加えて 24 時間培養した。24 時間後、培養上清を除去し、1 mL の TRI Reagent を加え、細胞を 1.5 mL チューブに回収した。2-6. と同様の方法で Total RNA を抽出し、Matrix Protein (Mタンパク質) を標的としたプライマーを用いて、2-9. と同様の方法で One-Step RT-qPCR を行い、細胞中のウイルス由来 RNA 量を解析した。

2-11. 統計解析

各実験結果より平均値と標準偏差を算出し、代表的なデータを示した。有意差検定はロックアウトマウスを使用した実験では、一元配置分散分析法 (One-way ANOVA), Tukey の多重比較検定を用いて行い、それ以外の実験では Student's t-test を用いて行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。統計処理は、GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用して行った。

3. 研究結果

3-1. 野沢菜および野沢菜漬けによる BMDC からのサイトカイン産生誘導

先行研究により、野沢菜不溶性画分を BMDC に添加することで、IL-12p70 産生が増加することが示されている。しかしながら、ウイルスに対する免疫において重要な I 型 IFN をはじめ、その他のサイトカイン産生に与える効果や、野沢菜漬けによる BMDC への効果は明らかになっていない。そこで、野沢菜および野沢菜漬けの不溶性画分を BMDC に添加し、各種サイトカインの mRNA 発現量を測定した。その結果、IFN- β の mRNA 発現は、野沢菜漬けに比べて野沢菜の刺激で発現が増加した。また、野沢菜と野沢菜漬けのいずれも、TNF- α の mRNA 発現を増加させた (図 1)。なお、グラフ中の「NZ」は野沢菜を指し、「NZP」は野沢菜漬けを示す。

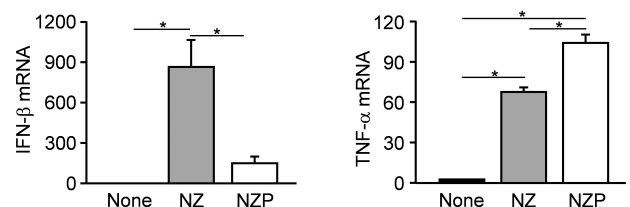


図 1. 野沢菜および野沢菜漬けで刺激した BMDC におけるサイトカイン mRNA 発現

次に、TNF- α 産生量の違いを確認するため、培養上清中に含まれる TNF- α の量を ELISA にて測定した。その結果、野沢菜および野沢菜漬けの不溶性画分のどちらの

刺激でも濃度依存的に TNF- α 産生量の増加が確認された (図 2).

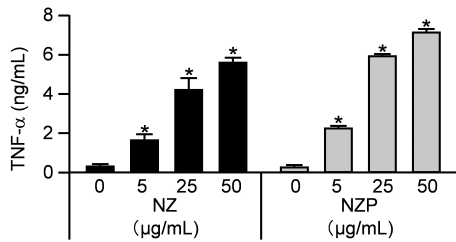


図 2. 野沢菜および野沢菜漬けで刺激した BMDC における TNF- α 産生量

3-2. TLR ノックアウトマウス由来 BMDC に対する野沢菜および野沢菜漬けのサイトカイン産生誘導効果

先行研究において、野沢菜が TLR に認識されてサイトカイン産生を誘導することが示されている。また、3-1 の実験結果から、野沢菜と野沢菜漬けでは IFN- β の遺伝子発現量に大きな差があることが示された。この結果から野沢菜と野沢菜漬けでは TLR への依存性に差があるのではないかと考えた。そこで、まず WT, TLR2 $^{-/-}$ および TLR4 $^{-/-}$ マウス由来 BMDC を野沢菜で刺激し、各種サイトカインの遺伝子発現量を解析した。その結果、野沢菜刺激で誘導される IFN- β mRNA 発現は、WT もしくは TLR2 $^{-/-}$ マウスに対して TLR4 $^{-/-}$ マウスで遺伝子発現量が低下することが明らかになった。また、TNF- α mRNA 発現についても TLR4 $^{-/-}$ マウスで遺伝子発現量が低下傾向であった (図 3)。一方、野沢菜漬けで刺激した場合、IFN- β , TNF- α mRNA 発現いずれも、WT と TLRKO マウスの間に違いはみられなかった (図 3)。

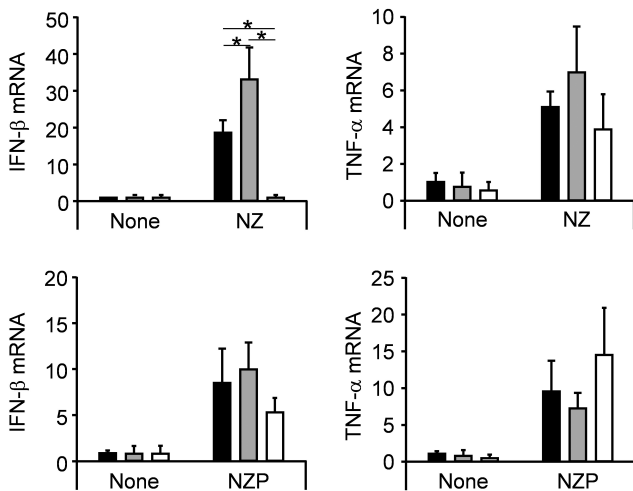


図 3. 野沢菜および野沢菜漬けで刺激した TLRKO マウス由来 BMDC におけるサイトカイン mRNA 発現

次に、サイトカイン産生量の変化を解析するため、WT および TLR2 $^{-/-}$, TLR4 $^{-/-}$ マウス由来 BMDC を野沢菜および野沢菜漬けで刺激し、培養上清中に含まれる TNF- α 産生量を測定した。その結果、野沢菜で刺激した時の TNF- α 産生は WT マウスに比べて TLR2 $^{-/-}$, TLR4 $^{-/-}$ マウスで低下した。一方、野沢菜漬けの刺激で誘導される TNF- α 産生量は WT マウスと TLRKO マウスで違いはみられなかった (図 4)。

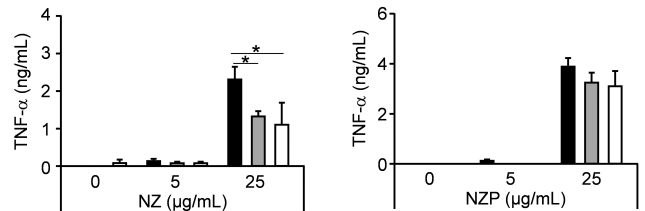
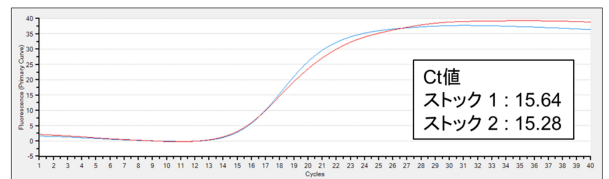


図 4 野沢菜および野沢菜漬けで刺激した TLRKO マウス由来 BMDC における TNF- α 産生量

3-3. インフルエンザウイルス由来 RNA の定量法の確立

作製したインフルエンザウイルスストックから RNA を抽出し、ウイルスの M タンパク質の遺伝子発現を qPCR にて解析した。その結果、Ct 値は、ストック 1 で 15.64、ストック 2 で 15.28 であり、標的とする遺伝子配列の増幅が確認された (図 5A)。また、PCR 産物を電気泳動により確認したところ、ストック 1、ストック 2 の両サンプルにおいて、プロダクトサイズである 245 bp 付近にバンドが検出された (図 5B)。これらの結果から、PCR 法によりインフルエンザウイルスの定量法を確立することができた。

(A)



(B)

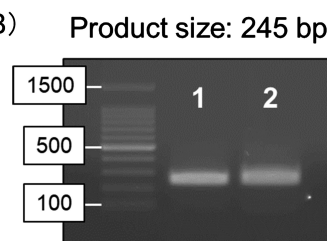


図 5. インフルエンザウイルス M タンパク質の mRNA 発現

3-4. 野沢菜および野沢菜漬けで処理した BMDC における抗ウイルス効果の検証

野沢菜および野沢菜漬けの抗ウイルス効果を検証するた

め、野沢菜および野沢菜漬けで処理した BMDC をウイルスに感染させ、細胞中のウイルス M タンパク質の遺伝子発現を qPCR にて解析した。その結果、無刺激と比較して野沢菜の添加によりウイルス由来 RNA 量の有意な減少が確認されたが、野沢菜漬けの添加ではウイルス量に変化はみられなかった (図 6)。以上のことから、野沢菜は野沢菜漬けに比べて抗ウイルス効果が高いことが示された。

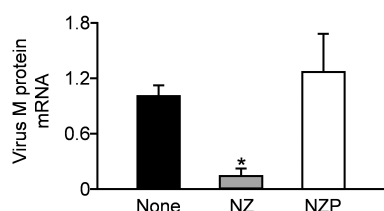


図 6. 野沢菜および野沢菜漬けで処理した BMDC におけるウイルス由来 mRNA の発現

4. 考察および今後の課題

本研究において、野沢菜および野沢菜漬けが樹状細胞を活性化させ、炎症性サイトカインの産生を誘導することが示された。また、野沢菜は抗ウイルス免疫において重要な IFN- β の産生を増加させた。加えて、サイトカイン産生誘導に関わるレセプターについて解析したところ、野沢菜は TLR4 を介していることが示された。さらに、ウイルスに感染させた樹状細胞において、野沢菜の添加によってウイルス量が減少した。以上のことから、野沢菜は抗ウイルス効果を有することが明らかにされた。

当研究室で行われた先行研究で報告されていたように、野沢菜は TLR2 および TLR4 により認識されることが示されている [3]。また野沢菜は TLR2 よりも TLR4 への依存性が強いことが示唆された。また、Li らは、キノコ的一种であるチョレイマイタケ (*Polyporus umbellatus*) から単離した多糖が TLR4 によって認識されることを報告している [9]。加えて、当研究室で行われた先行研究により、野沢菜の活性成分として多糖が同定されている。よって、野沢菜に含まれる多糖が TLR4 によって認識されると考えられる。

野沢菜および野沢菜漬けの抗ウイルス効果を確認するため、BMDC をインフルエンザウイルスで感染させて *in vitro* の実験を行った。その結果、無刺激と比較して野沢菜の添加でウイルス量が減少したが、野沢菜漬けの添加ではウイルス量に変化はみられなかった。加えて、野沢菜の刺激で誘導される IFN- β の mRNA 発現も野沢菜漬けに比べて有意に高かった。樹状細胞から産生される IFN- β は、オートクライン機構によって自身のレセプターでシグナルを受け取り、IFN 刺激遺伝子群 (ISG) の発現を増加させて抗ウイルス作用を増強することが知られている。野沢菜で確認された抗ウイルス効果のメカニズムについては

本研究で明らかにすることができなかったが、野沢菜の添加で BMDC からの IFN- β 産生が増加することが本研究により判明したため、野沢菜刺激により誘導された IFN- β により抗ウイルス免疫が増強したと予想した。今後は、野沢菜の IFN- β 産生を介した抗ウイルス作用の詳細なメカニズムについて解明する必要がある。

本研究により、野沢菜は樹状細胞のサイトカイン産生を誘導し、抗ウイルス効果をもつことが示された。将来的にはヒト介入試験を行い、野沢菜の摂取による抗ウイルス効果について証明したいと考えている。野沢菜および野沢菜漬けを摂取することで、ヒトにおいても抗ウイルス免疫の増強を確認することができれば、日々の食事で摂取することで恒常的な免疫機能の向上が期待でき、毎年流行するインフルエンザウイルスや、新型コロナウイルスなどの感染症によるパンデミックを防ぐことができるのではないかと考える。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、2020 年度研究助成を受け賜りました (公財) 東洋食品研究所に深く感謝申し上げます。また、インフルエンザウイルスをご提供くださいました国立感染症研究所に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. Tsai YT; Cheng PC; Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, **96**, p. 853-62. doi: 10.1007/s00253-012-4407-3.
2. Jounai K; Sugimura T; Ohshio K; Fujiwara D. Oral administration of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 enhances lung immune response resulting in protection from murine parainfluenza virus infection. *PLoS One.* 2015, **10**, e0119055. doi: 10.1371/journal.pone.0119055. eCollection 2015.
3. Jounai K; Ikado K; Sugimura T; Ano Y; Braun J; Fujiwara D. Spherical lactic acid bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells. *PLoS One.* 2012, **7**, e32588. doi: 10.1371/journal.pone.0032588. Epub 2012 Apr 10.
4. Suzuki H; Tsuji R; Sugamata M; Yamamoto N; Kanauchi O. Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria is effective against dengue virus infection in

- mice. *Int. J. Mol. Med.* 2019, **43**, p. 426-34. doi: 10.3892/ijmm.2018.3955. Epub 2018 Oct 24.
5. 大澤 克己; 高波 修一; 栗林 剛; 桑原 秀明. 野沢菜漬からの乳酸菌の分離同定及びその微生物相の変化について. 長野県工業技術総合センター食品技術部門研究報告. 2005. **33**. p. 9-13.
 6. Yamamoto K; Furuya K; Yamada K; Takahashi F; Hamajima C; Tanaka S: Enhancement of natural killer activity and IFN- γ production in an IL-12-dependent manner by a *Brassica rapa* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2018, **82**, p. 654-68. doi: 10.1080/09168451.2017.1408396.
 7. Takahashi F; Endo K; Matsui R; Yamamoto K; Tanaka S. *Brassica rapa* L. activates macrophages via Toll-like receptors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2021, **85**, p. 656-65. doi: 10.1093/bbb/zbaa075.
 8. Sandagdorj B; Hamajima C; Kawahara T; Watanabe J; Tanaka S. Characterization of Microbiota that Influence Immunomodulatory Effects of Fermented *Brassica rapa* L. *Microbes Environ.* 2019, **34**, p. 206-14. doi: 10.1264/jsme2.ME19003. Epub 2019 Jun 6.
 9. Xingqun Li; Wen Xu. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries. *Journal of ethnopharmacology.* 2011, **135**, p. 1-6. doi: 10.1016/j.jep.2010.06.028. Epub 2010 Jul 1.