

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン 9 分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

研究課題名	ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン 9 分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防		
フリガナ	ミズノ マサシ		
代表者名	水野 雅史		
所属機関（機関名） （役職名）	神戸大学大学院農学研究科 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	榊原 啓之 （サカキバラ ヒロユキ）	宮崎大学農学部	食品中の活性物質の分析と 同定
本助成金による発表論文，学会発表	該当なし		

研究結果要約

近年、我が国において花粉症を始めとする I 型アレルギーの発症率は、年々増加の一途をたどっている。これまでにマコンブに含まれるフコイダンを経口摂取した時にのみ IgE との親和性が高いガレクチン 9 (Gal9) が血中に分泌され I 型アレルギーが抑制されることを明らかにした。しかしながら、コンブには健康被害を及ぼすヒ素（乾物重当たり約 53mg）が含まれており、過剰にコンブを摂取することは健康面からすると問題である。そこで本研究では、フコイダンと同時に摂取することでアレルギー抑制効果を増強させる食品を探索し、それに含まれる有効成分をポリフェノール類を中心に同定することでアレルギー予防が期待できるポリフェノールカクテルを選定し、I 型アレルギー予防に貢献できる食品の食べ合わせを提唱していくことを目的とした。その結果、野菜類ではネギおよびタマネギに、藻類ではノリからの抽出物に増強効果が認められた。そこで活性が認められた野菜とそうでない野菜類中の各ポリフェノール類を比較したところ、ポリフェノールカクテルの候補としてはケルセチンやケンフェロールなどのフラボノール類が見出され、それらを豊富に含んでいる豆苗やオクラが列挙された。一方、ノリ抽出物にも同様の相乗効果を示すことが本研究の一環から見出されたが、フコイダンとは全く違った抑制機構を介することによって抗アレルギー効果を相乗効果に示していることが明らかとなった。

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

研究目的

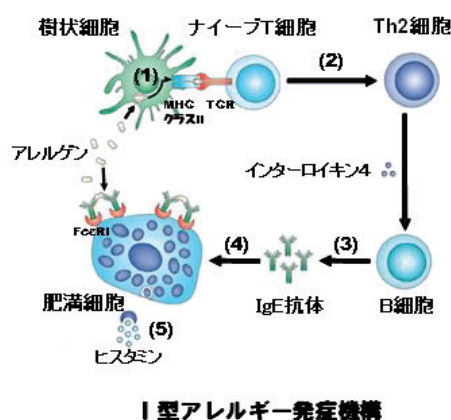
I型アレルギーモデルである受動皮膚アナフラキシー（PCA）において、フコイダン経口摂取が耳介の浮腫を抑制すること、またその作用機序はアレルギー発症において重要な働きをしているIgEとの親和性が高いガレクチン9（Gal9）が血中に分泌され、その結果肥満細胞とIgEとの結合が阻害されるためであることを明らかにしたり。また、オボアルブミン（OVA）により感作されたマウスにおいてもフコイダン経口投与によりアレルギーが抑制されることも明らかにしてきた。一般に花粉症や食物アレルギーに代表されるI型アレルギー発症には、（1）樹状細胞によるアレルゲン認識、（2）ナイーブT細胞から2型ヘルパーT細胞（Th2）への分化誘導、（3）B細胞のIgE産生へのクラススイッチ、（4）IgEと肥満細胞の結合といった一連の反応系、いわゆる感作状態、（5）再度のアレルゲン曝露による脱顆粒によりアレルギーが発症すると言われている（下図参照）。このような発症経路の中で、OVA感作によるフコイダンの抗アレルギー効果については、（4）の部分に阻害するという新規のアレ

ルギー抑制機構を提唱した。さらにフコイダンは感作後のマウスに対してもアレルギーを抑制できる事も明らかにし、これまで報告されているTh1/Th2バランスを調整することでアレルギーを抑制する食品因子とは異なった機能を備えた食品因子として意義のある物質であることを明らかにしてきた²⁾。このようにフコイダンを豊富に含むコンブを摂取することは、アレルギー発症の抑制あるいは予防において非常に有意義なことに思われる。しかしながら、コンブには蓄積すると健康被害を及ぼすヒ素が含まれており、アレルギー予防を目的にコンブ摂取によって十分量のGal9分泌促すことは健康の面からすると問題が生じる。そこで本研究では、フコイダンと同時に摂取することでアレルギー抑制効果を増強させる食品を探索し、その食品に共通に含まれる成分を同定することでアレルギー予防が期待できるポリフェノールカクテルの構築を目的とした。

研究計画及び研究方法

研究計画

フコイダンを経口摂取すると血中にGal9が分泌され、このGal9がIgEと結合することでアレルギーを抑制すること、経口摂取した場合のみアレルギーが抑制されること、アレルゲンに感作された後からフコイダンを摂取してもアレルギーが抑制されることなど、食事から摂取するのに適した機能性素材であることをこれまでに明らかにしてきた。しかしながら、その一方で人体に影響が懸念されるヒ素を含んでいるため大量に摂



ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

取することは好ましくないとされている。そこで本研究では、コンブとの食べ合わせにより、抗アレルギー作用の相乗効果が期待できるポリフェノールカクテルを構築することを目的とした。そのため以下の①と②の実験を計画した。

① PCA 試験を用いてフコイダンによる Gal9 分泌を促進する食品素材の探索

5 週齢、雌の BALB/c マウスに抗アレルギー効果を示さない濃度（これまでの経験から 100 µg/ml 以下であることが判明¹⁾）のフコイダンと共に青果物のホモジネートを同時に 4 日間、毎日胃内強制投与した後、抗 DNP-IgE を尾静脈より投与し、その 30 分後に最初の耳介厚を測定した。さらに、その直後抗原 (Ag) である DNP を耳介に塗布し、2 時間後に再び耳介厚を測定した。この刺激前後の耳介厚の差を IgE/Ag による浮腫とし、その差の増加度合いで抗アレルギー効果を判断した。また、血中の Gal9 分泌量については抗 IgE 抗体を用いて免疫沈降法で IgE 画分を調整し、その上で抗 Gal9 抗体を用いたウェスタンブロット法で検出して、組み合わせによる Gal9 分泌促進効果を確認する。これらの結果から、候補となる青果物を選抜する。共同研究者によって明らかとなったポリフェノール類から、一つずつ化合物を除いて同様の実験を行い、必要最小限のポリフェノール類を明らかにする。

② ポリフェノールカクテルの構築

実験①で効果のあった青果物エキスとなかつ

たものをポリフェノール分析システム (HPLC-PDA) に供し、構築したポリフェノールライブラリーから活性物質を想定し、ポリフェノールカクテル候補リストを作成する。この時、候補化合物が未知成分である場合は、LC-MS/MS、NMR などの分析技術を駆使してその構造を同定する。また必要に応じて、HPLC を用いた候補化合物の単離・精製を行い、十分量の化合物を調整しカクテル用試薬として準備する。最後に、実験①から明らかとなったポリフェノールカクテルを理想的に含んでいる青果物を見出す。

研究手法

1. フコイダン画分の抽出

基本的には Tanino ら¹⁾の方法に従った。具体的には、液体窒素と共に乾燥マコンブをワーニングブレンダーを用いて粉碎した後、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥物を得た。次に凍結乾燥物に対して 20 倍量の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) を加えて、4℃で一昼夜攪拌抽出した。その後遠心分離 (3,500 rpm、10 分)により、上清を採取し容量の半分になるまで減圧濃縮を行った。この濃縮液に 2 倍量のアルコールを加え再び一昼夜 4℃で保存した後、遠心分離により残渣を回収しフコイダン画分とした。

2. 各野菜抽出物の調整

野菜中に含まれるポリフェノール類画分を抽出する方法は常法にしたがって抽出した³⁾。市販されている新鮮な各野菜を包丁で細かく刻み、液

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

体室素で凍らせて乳鉢で粉末状に砕いた。その後、凍結乾燥機を用いて乾燥させた。得られた凍結乾燥物に対して、20倍量の80%エタノールを加えて25℃で一晩振盪した。懸濁液を吸引ろ過して得られたろ液を減圧濃縮してエタノールを完全に蒸発させ、これを再び凍結乾燥させたものを野菜抽出物とした。

また、野菜中に含まれるポリフェノールを同定するために、加水分解を実施した。具体的には、野菜の凍結乾燥物(50mg)を塩酸加水分解した後、酢酸エチル抽出した。

3. ノリ多糖画分の抽出

凍結乾燥機を用いて乾燥ナラワスサビノリを乾燥させた後、ビーズショッカーで粉碎(3,000rpm×10秒)した。この乾燥粉末1gに対して25mlの蒸留水を加え室温で一晩攪拌抽出した後、遠心分離(3,500rpm×10分)して沈殿を回収した。この沈殿物に1回目と同量の蒸留水を加えて室温で1時間攪拌した後、再び同条件で遠心分離して沈殿を回収した。この沈殿を凍結乾燥し、50倍量の0.2%酢酸水溶液を加えて50℃で一晩静置し、遠心分離(3,500rpm、10分)によって上清を回収した。回収液は、1M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7に調整した後、2倍量の100%エタノールを加えて4℃で一晩遠攪拌した後、遠心分離(3,500rpm×10分)した後沈殿を回収し、100%エタノールで2回洗浄した。これを蒸留水に溶解して、室温で一晩透析して脱塩に供した。この溶液を凍結乾燥し、ナラワスサ

ビノリ多糖画分とした。

4. 陰イオン交換クロマトグラフィー

研究手法1で調整した画分を陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。交換体としてはToyopearl-DEAE 650Mを用い、溶離液としては0.05M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に0.5Mおよび1.0M NaClのステップワイズ方で溶出した。それぞれの画分は、フェノール硫酸法によって糖含量を測定した。検量線には、フコースを標準物質として作成し、フコース当量で算出した。

5. 受動的アナフラキシー(PCA)反応

5週齢、雌のBALB/cマウスに抗アレルギー効果を示さない濃度(これまでの経験から100μg/ml以下)のフコイダンと共に青果物のホモジネートを同時に4日間、毎日胃内強制投与した後、抗DNP-IgEを尾静脈より投与し、その30分後に最初の耳介厚を測定した。さらに、その直後抗原(Ag)であるDNP-BSAを耳介に塗布し、2時間後に再び耳介厚を測定した。この刺激前後の耳介厚の差をIgE/Agによる浮腫とし、その差の増加度合いで抗アレルギー効果を判断した。Gal9あるいは各種サイトカインの中和抗体による耳介浮腫への影響を確認する際には、抗DNP-IgEを尾静脈から注射する1時間あるいは2時間前に、それぞれの中和抗体を1μgあるいは10μg尾静脈から投与した後、上述と同様にPCA反応を行った。

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

6. HPLC 分析

上記 2 で調整した野菜抽出物および加水分解物を 0.5%トリフルオロ酢酸含有メタノールに溶解後、メンブレンフィルターろ過したものを次の条件で HPLC に供した: HPLC システム JASCO system control program (LC-NetII/ADC)、カラム: CAPCEL PAK C18 UG120, S5, 3 μ m, 3.0 mm I.D. $\times$ 150 mm (大阪ソーダ) 移動相: 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.3) とメタノールの低圧グラジェント。定量は、加水分解物の測定結果より、野菜中に含まれるフラボノイドアグリコンの有無を確認した。次に、アグリコンの存在を確認できた野菜抽出物を HPLC に供し、溶出時間と吸収スペクトルがライブラリ内のデータと一致した場合は、その標準物質の検量線から含有量を求めた。溶出位置と吸収スペクトルがライブラリ内のデータと一致しなかったが、そのスペクトル情報から、フラボノイド等のポリフェノール類の種別できた場合は、類似した骨格を有する標準品の検量線を用いて含量を求めた。

結果と考察

1. 野菜抽出物の共投与でのアレルギー抑制作用

ポリフェノールを多く含む野菜について、その抽出物がフコイダンのアレルギー抑制作用を増強するかどうか検討した。ポリフェノールである

ルテオリンについては、400 μ g の4日連続経口投与が PCA 反応においてアレルギー抑制作用を示すことが分かっている⁴⁾。そこでルテオリン単独では抗アレルギー効果を示さない濃度を検討した結果、200 μ g 以下であることが分かった。この 200 μ g は Hostetler ら⁵⁾の報告によると、ルテオリンを多く含む赤ピーマンの新鮮重2.33 g 相当だと算出された。そこで、これを基準量として他の野菜抽出物についても新鮮物換算で2.33g 相当の凍結乾燥物を一日の投与量とした。一方フコイダン投与量は、既報から一日100 μ g とした¹⁾。フコイダンと野菜抽出物の共投与による耳介浮腫の抑制効果を図1に示した。抗原・抗体反応によって誘導された耳介浮腫は、200 μ g フコイダン投与によって有意に抑制されたが、100 μ g 投与では抑制は認められなかった。しかしながら、タマネギあるいはネギ抽出物とフコイダンの共投与によって耳介浮腫は有意に抑制され、その効果はほぼ200 μ g フコイダン投与と同等の抑制率を示した。一方、赤ピーマンおよびショウガとの共投与では効果は認められなかった。これ以外の野菜抽出物についても検討したが、有意に抑制を示す野菜は認められなかった。これらの結果から、フコイダンの共投与によって抗アレルギー効果を増強させる野菜としてタマネギおよびネギが有効であることが明らかとなったが、摂取量に関してはフコイダン単独の約半分程度であった。

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

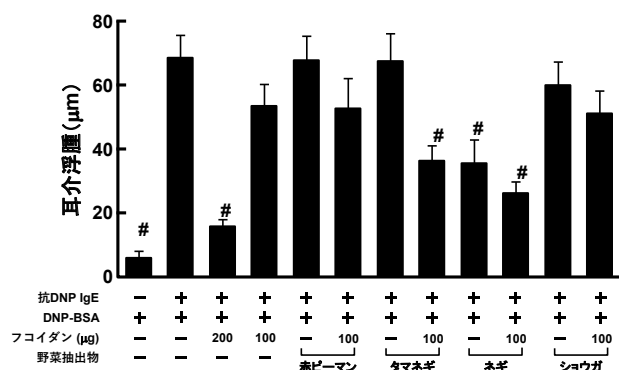


図1. PCA反応試験におけるフコイタンと野菜抽出物との共投与における耳介浮腫抑制効果

#: 抗体/抗原反応区と比較して有意差があることを示す ($p < 0.05$)。Tukey-Kramer test。平均値 ± SE。

2. HPLC 分析によるアレルギー抑制効果を増強させるポリフェノール類の検討

上記1の試験で効果が見られた抽出物と効果が見られなかった抽出物を HPLC に供した結果を表1に示した。効果が見られた2つの野菜(タマネギ、ネギ)と効果が見られなかった2つの野菜(赤ピーマン、ショウガ)を比較すると、効果が見られた野菜にはケルセチン(タマネギ)やケンフェロール(ネギ)が豊富に含まれていることがわかった。一方、効果が見られなかった野菜では、ルテオリン(赤ピーマン)やフェノール酸(ショウガ)が豊富であった。これらの結果から、フコイタンとの共投与によって抗アレルギー効果を増強させる成分は、フラボノール類(ケルセチンやケンフェロール)であることが分かった。一方、フラボン類(ルテオリン)やフェノール酸などのポリフェノール類の増強効果は弱いことも示された。

次に、日本人が日常的に摂取する野菜や果物、茶類53種88部位を分析に供し、フラボノール類を豊富に含む野菜や果物を探索した。その結果、

表1. 各野菜抽出物に含まれるポリフェノール類含有量

	フラボノイド類	フェノール酸類		
	μg/g抽出物			
タマネギ	quercetin-7-O-glucoside	4.81	—	
	quercetin-3,4'-di O-glucoside	0.20		
	rutin	0.07		
	quercetin	0.07		
	quercetin glycosides	6.41		
ネギ	kaempferol glycosides	3.37	cinnamic acids	3.44
	quercitrin	0.82		
赤ピーマン	luteolin glycosides	2.76	cinnamic acids	0.43
	methoxy flavone	0.78		
ショウガ	—		cinnamic acids	67.51

ケンフェロールを豊富に含む野菜として、ブロッコリー、小ネギ、豆苗、アボガド(皮)、カイワレ、小松菜(葉)、菜の花、ソラマメ(皮)が、またケルセチンを豊富に含む野菜として、スナップエンドウ(皮)、フリルレタス、オクラ、グリーンピース(皮)を見出した。

3. コイダンとノリ多糖画分との共投与でのアレルギー抑制作用

フコイタンとナラワスサビノリ多糖画分のそれぞれ単体ではアレルギー抑制作用を示さない量での共投与によって、アレルギー抑制作用が発揮されるかについて検討した。そのためまずノリ多糖類の投与量を検討した結果、図3に示すとおりノリ多糖画分500 μgまたは250 μgの経口投与では耳介浮腫の抑制は認められなかった。そこで既に抗アレルギー効果を示さないことが明らかとなっている100 μgと共投与した場合の耳介浮腫に対する効果を検討した。その結果、フコイタン100 μg投与区ではノリ由来多糖画分は250 μg以上で耳介浮腫の抑制が認められた。さらにフコイタン50 μg投与区ではノリ由来多糖画

ヒ素摂取量低減を目的としたフコイダンの血中ガレクチン9分泌を促進させる食品成分との食べ合わせによるアレルギー発症予防

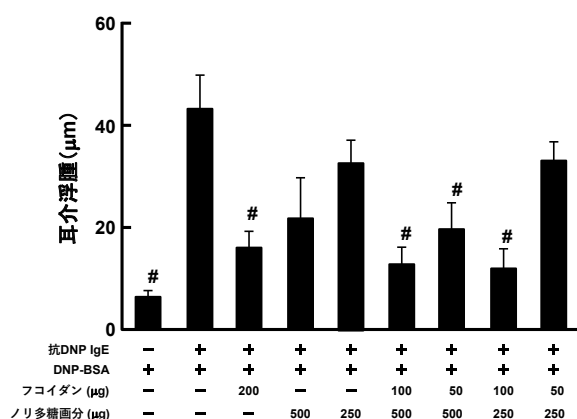


図3. PCA反応試験におけるフコイダンとナラワスサビノリ多糖画分との共投与による耳介浮腫抑制効果
#: 抗体/抗原反応区と比較して有意差があることを示す ($p<0.05$)。Tukey-Kramer test。平均値±SE。

分 500 μg 投与で抑制が認められ、フコイダン単独で抑制効果を示す量の 4 分の 1 まで投与量を削減させることができることが明らかとなった。ポリフェノール類の結果に比べると、さらに半分量までフコイダンの摂取量を削減できることが示唆された。

4. フコイダンとノリ多糖画分のアレルギー抑制機構の相違

今までに研究でフコイダンの抗アレルギー効果は、経口投与した場合のみに認められることと、その作用機序は血中に Gal9 が分泌されることを明らかにしてきた¹⁾。一方、ノリ多糖画分についてはその作用機構についてはよく分かっていないので、サイトカインに着目しそれぞれの中和抗体を用いて PCA 実験を行った。その結果、Gal9 以外に IL-10 中和抗体を抗 DNP-IgE を尾静脈から注射する前に尾静脈注射したときに、フコイダンとノリ多糖画分による耳介浮腫抑制が解消された(図4)。これらのことより、フコイダンとノリ多糖によるアレルギー抑制機構は異なった機

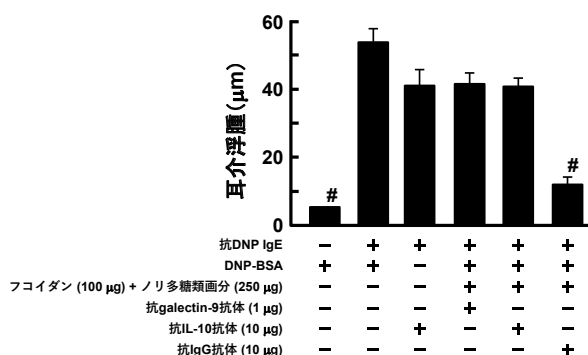


図4. フコイダンとナラワスサビノリ多糖画分との共投与による耳介浮腫抑制効果に対する各中和抗体の影響
#: 抗体/抗原反応区と比較して有意差があることを示す ($p<0.05$)。Tukey-Kramer test。平均値±SE。

構により相乗的に効果を発揮していることが明らかとなった。Liua ら⁶⁾は、紅藻類を経口摂取することで血中に IL-10 が分泌されることを報告している。また、Norton ら⁷⁾は、IL-10 が肥満細胞に発現している IgE に高親和性を示す FcεRI の発現を抑制することを報告している。これらの報告を総合すると、ノリ多糖類の経口投与によって血中に IL-10 が分泌されることによって肥満細胞上の FcεRI 発現が抑制されるため、IgE の肥満細胞が抑制されるためにアレルギー発症が抑制されたと考えられた。

当初予定していた研究計画の内、フコイダン摂取量を削減できる食品の候補としては、赤ピーマンとショウガが見出された。またこれらの中に含まれるポリフェノール類と候補に挙げられなかった食品中のポリフェノールを HPLC 分析で比較すると、ケルセチンやケンフェロール骨格を有するフラボノール類が活性を有する候補化合物として見つかった。また、これらの成分を豊富に含む野菜としてブロッコリー、豆苗、小松菜(葉)

およびオクラを見出した。今後は、この情報を元にフコイダンが有する抗アレルギー効果を増強できるポリフェノールカクテルの構築を視野に入れた研究が可能になると考えられる。一方、今回の研究から紅藻類であるナラワスサビノリに含まれる多糖画分にもフコイダンと共投与することで、抗アレルギー効果画像今日できることを見いだせたことは、予定していた研究以外の成果と判断できる。しかもその抑制機構は、フコイダン投与による Gal9 分泌増強を促すのではなく、抗炎症性のサイトカインである IL-10 分泌促進によることを見いだすことができた。

今後の研究活動について

今回得られた結果を基に、当初予定していたフコイダンとの共摂取により抗アレルギー効果を高めるポリフェノールカクテルの構築を目指していくのが、直近のやるべきことと考えている。そのためには、我々の研究室で開発した腸上皮細胞である Caco-2 と肥満細胞である RBL-2H3 との共培養系を用いて、適切な組み合わせを選抜してから PCA 反応へと展開するのも一案かと考えている。また、ノリ由来多糖画分による抗アレルギー効果がフコイダンの場合とは異なることから、血中 IL-10 分泌を促進する食品を選抜することで、新たなアレルギー抑制を視野に入れた食品の探索に利用できないかを模索しているところである。

参考文献

- 1) Tanino Y, Hashimoto T, Ojima T, Mizuno, M. F-fucoidan from *Saccharina japonica* is a novel inducer of galectin-9 and exhibits anti-allergic activity. J Clin Biochem Nutr. 2016;59(1):25–30.
- 2) Mizuno M, Sakaguchi K, Sakane, I. Oral administration of fucoidan can exert anti-allergic activity after allergen sensitization by enhancement of galectin-9 secretion in blood. Biomolecules. 2020;10(2):258; <https://doi.org/10.3390/biom10020258>.
- 3) Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. J Agric Food Chem. 2003;51:571–581.
- 4) Yamashita S, Yokoyama Y, Hashimoto T, Mizuno, M. A novel *in vitro* co-culture model comprised of Caco-2/RBL-2H3 cells to evaluate anti-allergic effects of food factors through the intestine. J Immunol Meth. 2016;435:1–6.
- 5) Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz

- SJ. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Adv Nutr.* 2017;8:423–435.
- 6) Liua QM, Xu SS, Li L, Pan TM, Shi CL, Liu H, Cao MJ, Su WJ, Liu GM. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*, *Carbohydr Polym.* 2017;165:189–196.
- 7) Norton SK, Barnstein B, Brenzovich J, Bailey DP, Kashyap M, Speiran K, Ford J, Conrad D, Watowich S, Moralle MR, Kepley CL, Murray PJ, Ryan JJ. IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2008;180: 2848–2854.