

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580226

研究課題名（和文） 色落ち海苔の多糖を活用した免疫機能性食品素材の開発

研究課題名（英文） Development of immunopotentiating food material using polysaccharide from discolored laver

研究代表者

岡崎 勝一郎 (OKAZAKI KATSUICHIRO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60109733

研究成果の概要（和文）：海苔の色落ちは天候やその他の要因で発生するが商品とはならずほとんどが廃棄されている。これを有効利用するため海苔の細胞壁に多量に含まれる粘性のある酸性多糖であるポルフィランを効率的かつ短時間で調製した。精製ポルフィランの免疫細胞に与える影響をマウスのマクロファージ培養細胞 (J774.1) とリポ多糖 (LPS) に対する応答性が高い C3H/HeN 系マウスの脾臓細胞で検討した結果、細胞性免疫を増強するサイトカインであるインターロイキン (IL)-12 とインターフェロン- $\gamma$  の産生誘導が乳酸菌や LPS と同様に認められ、マクロファージ上の Toll 様受容体 4 を介して LPS と同様に IL-12 の産生を増強していることが示唆された。また、腫瘍壊死因子あるいは過酸化水素で刺激したヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 細胞で産生増強される炎症性サイトカインである IL-8 の産生をポルフィランと乳酸菌は抑制し、経上皮電気抵抗値で測定した腸管のバリア損傷に対する抑制効果もポルフィランに認められた。以上のことから、食物として摂取している海苔中のポルフィランには細胞性免疫の賦活化作用と腸管細胞での抗炎症作用といった乳酸菌と同様な健康機能効果があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We examined cytokine productions in mouse macrophage-like cell line (J774.1) and in mouse primary spleen cells by porphyran purified from discolored nori (edible laver). The production of interleukin (IL)-12 in J774.1 cells was enhanced by porphyran, lipopolysaccharide (LPS) and heat-killed *Lactobacillus plantarum*. In primary spleen cells from C3H/HeN (sensitive to LPS) mice, the productions of IL-12 and interferon (IFN)- $\gamma$  were enhanced by porphyran, LPS, and *L. plantarum*. These results suggest that porphyran induces cell-mediated immune response promoted by T helper 1 type cells. Therefore, porphyran from discolored laver can be useful for development as functional food material to protect decrease of cellular immunity in aging. In addition, antiinflammatory effect of porphyran was also showed in human intestinal Caco-2 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：動物細胞工学

科研費の分科・細目：水産学、水産学一般

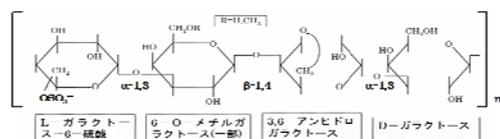
キーワード：海苔・多糖・免疫機能・マクロファージ・細胞性免疫・腸炎抑制・乳酸菌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫系は、自然免疫系と獲得免疫系の2つに大別される。自然免疫系では好中球やマクロファージなどの食細胞とナチュラルキラー(NK)細胞が異物を排除する。獲得免疫系では、抗原と特異的に結合するアレルギーに関与するIgEなどの抗体をB細胞が産生する体液性免疫と抗原により活性化されたT細胞が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫がある。TあるいはB細胞活性化を補助するヘルパー(Th)T細胞には1型と2型があることが見つけられて以来、免疫力はTh1型(細胞性免疫)とTh2型(体液性免疫)細胞数のバランスの上に成り立っていると考えられている。全身の組織中にあるマクロファージや樹状細胞は免疫系の中心に位置して、自然免疫系と獲得免疫系をともに活性化する。

(2) 特定の乳酸菌には、マクロファージを活性化してサイトカインであるインターロイキン(IL)-12を産生し、ヘルパーT細胞のTh1型への分化増殖を促進することにより細胞性免疫を増強するとともに、Th1型細胞により生産されるインターフェロン(IFN)- $\gamma$ がTh2型への分化増殖を抑制するのでアレルギー抑制効果がある。IL-12は自然免疫系のNK細胞も活性化するので、体内で絶えず発生する変異した異常な癌細胞等を監視し初期に排除できる。これまでキノコ由来の $\beta$ -グルカンや海藻由来の硫酸多糖であるフコイダン等の多糖にも乳酸菌と同様な細胞性免疫を増強する免疫賦活化作用があることが知られている。さらに、乳酸菌には腸管での炎症の抑制効果も報告されている。

(3) 海苔は毎年約100億枚生産されている。海苔の色落ちは天候やその他の要因で毎年発生するが、商品とはならずほとんどが廃棄されている。海苔の細胞壁に多量に含まれるポルフィラン(化学構造は下図)は乾燥海苔の約30%と多量に含まれている粘性のある酸性多糖であり、保湿性、抗菌性や整腸作用などの生理活性を有することが知られている。しかしながら、精製については熱水抽出後アルコールを加え沈殿させる実験室レベルにとどまっている。免疫賦活化試験もマウスのマクロファージの活性化だけにとどまり、現代社会におけるアレルギー体質に偏った免疫バランスを改善させるための有効性を示す厳密な試験はなされていない。



多糖ポルフィランの構造

## 2. 研究の目的

ポルフィラン多糖を効率的かつ短時間で調製する技術を確認するため中空糸膜を用いた精製方法を確立するとともに、精製ポルフィランの細胞性免疫応答の増強効果と抗炎症作用をマウスのマクロファージ培養細胞株と脾臓細胞及びヒト腸管上皮様細胞株を用いて明らかにして、未利用色落ち海苔の健康食品素材としての有用性を確立することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌由来のリポ多糖(LPS)と乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* L137)を陽性対照として使用した。

(2) マウスマクロファージ様細胞株(J774.1)を48プレートの各well ( $2.5 \times 10^5$  cells / 0.5 ml)に入れて37°Cで培養(RPMI1640培地中)した。翌日ポルフィラン、LPSあるいは乳酸菌を所定濃度となるように調製した培養液(0.5 ml)と交換して、さらに1日培養後、培養上清中のIL-12を酵素免疫測定法で定量した。

(3) 8週齢♀マウスのC3H/HeN(リポ多糖LPSに対する応答性が高い)系とC3H/HeJ(LPSに対する応答性が低い)系から調製した脾臓細胞を24プレートの各well ( $2 \times 10^7$  cells / 0.5 ml)に入れた後、検定物質を含む培養液(0.5 ml)を添加して37°Cで1日後、培養上清中のIL-12とIFN- $\gamma$ を酵素免疫測定法で定量した。

(4) 24プレートのwell内に設置したインサート内で37°C3日毎に培養液を交換しながら9日培養したヒト由来腸管細胞株(Caco-2)を腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ )あるいは過酸化水素( $60 \mu\text{g/ml}$ )で基底膜側から刺激し、管腔側(細胞外)にポルフィランあるいは乳酸菌を加え、さらに2日間培養後、細胞間の密着結合の程度を電気抵抗値(TER)で測定するとともに、管腔側に分泌されてくる炎症性サイトカインであるIL-8を酵素免疫測定法で定量した。

## 4. 研究成果

(1) 色落ち海苔からのポルフィランの調製: 色落ち海苔(図1)に10%1,3-ブタンジオール(ブチレングリコール)存在下100°C、15分加熱し、冷却後、不織布(生ゴミ水切り用)で粗濾過した。さらに、濾過助剤(ラジオリイト#800)を用いてアドバンテックGF-75で濾過した。得られた淡黄色の透明な液を分子量50,000カットの中空糸膜を用いた限外ろ過装置で透析と濃縮した(図2)。これにより色は抜けて無色のややドロリとした溶液と

なり、これを凍結乾燥した。その結果、ポルフィランの収量は乾燥海苔重量当たり 17.5%で、効率的かつ短時間な精製方法で十分純度の高い多糖を調製する技術を確認できた。



カラム

図 1. 色落ち海苔 図 2. 限外ろ過膜装置

(2) マウスマクロファージ様培養細胞株での IL-12 の産生誘導 : J774.1 細胞はマウスマクロファージ様培養細胞株で免疫賦活化作用のある物質の検定に広く用いられている。ポルフィランは、J774.1 細胞において、濃度依存的に IL-12 の産生を誘導し、無処理の場合と比較して約 23~35 倍増強させ、100  $\mu$ g/ml の濃度では乳酸菌死菌体 (10  $\mu$ g/ml) の 1.7 倍の増強効果があった (図 3)。

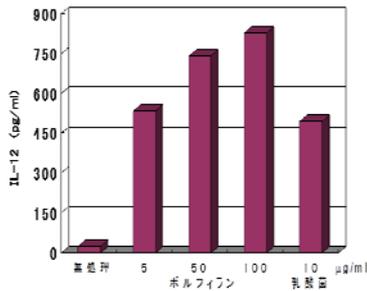


図 3. J774.1 細胞でのポルフィランと乳酸菌による IL-12 の産生誘導.

(3) BALB/c と C57BL/6 系マウス脾臓細胞での IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生誘導 : マウス脾臓から初代培養された細胞中にはマクロファージや Th 型細胞等の免疫細胞が存在している混合細胞培養系であり、マクロファージからの IL-12 産生増強による Th1 型細胞が生産する IFN- $\gamma$  の産生増強を検出することができ、細胞性免疫の活性化を見ることができる。8 週齢♀マウスから調製した脾臓細胞を 24 プレートの各well ( $5 \times 10^6$  cells / 0.5 ml) に入れた後、検定物質を含む培養液 (0.5 ml) を添加して 37°C で 1 日後、培養上清中の IL-12 と IFN- $\gamma$  を酵素免疫測定法で定量した。BALB/c 系マウス脾臓細胞では、ポルフィラン (50  $\mu$ g/ml) と LPS (0.25  $\mu$ g/ml) の刺激による IL-12 の産生増強は認められなかったが、IFN- $\gamma$  (約 120-170 pg/ml) の産生増強があった。C57BL/6 系マウス脾臓細胞でも、ポルフィラン (50  $\mu$ g/ml) と LPS (0.25  $\mu$ g/ml) の刺激による IL-12 の産生増強は認められなかったが、

IFN- $\gamma$  (約 200 pg/ml) の産生増強があった。したがって、BALB/c と C57BL/6 系マウス脾臓細胞では、ポルフィランと TLR 様受容体 (TLR)-4 を介してマクロファージを刺激することが知られている LPS による IL-12 の産生増強による Th1 型細胞の IFN- $\gamma$  の産生誘導を明確にはできなかった。しかしながら TLR-2 を介してマクロファージを刺激することが知られている乳酸菌死菌体 (20  $\mu$ g/ml) は両系統の脾臓細胞で IL-12 (BALB/c 系で約 200、C57BL/6 系で 500 pg/ml) と IFN- $\gamma$  (BALB/c 系で約 1000、C57BL/6 系で約 4400 pg/ml) の産生増強がともに認められた。また、IL-12 と IFN- $\gamma$  産生量から比較すると、C57BL/6 系が BALB/c 系よりも細胞性免疫が本来強いことも確かめられた。

(4) C3H/HeN と C3H/HeJ 系マウス脾臓細胞での IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生誘導 : BALB/c と C57BL/6 系マウス脾臓細胞では、ポルフィランの IL-12 産生増強による Th1 型細胞の IFN- $\gamma$  の産生誘導を明確にはできなかった。そこで、LPS に対する応答性が高い C3H/HeN 系と LPS に対する応答性が低い C3H/HeJ 系から調製した脾臓細胞におけるポルフィラン (50  $\mu$ g/ml) による IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生増強を酵素免疫測定法で定量した (図 4)。C3H/HeN 系統のマウス脾臓細胞ではポルフィランと LPS (0.1  $\mu$ g/ml) による IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生増強が認められたが、C3H/HeJ 系統のマウス脾臓細胞ではポルフィランによる IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生増強は認められなかった。LPS では C3H/HeJ 系統マウス脾臓細胞での IFN- $\gamma$  の産生増強が認められなかった。

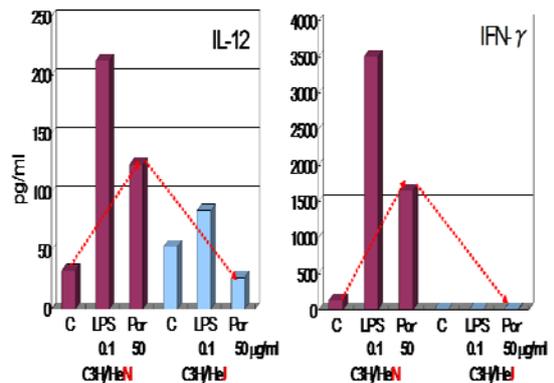


図 4. C3H/HeN と C3H/HeJ 系マウス脾臓細胞でのポルフィラン (Por) と LPS による IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生誘導. C: 無処理

したがって、ポルフィランと TLR-4 を介してマクロファージを刺激することが知られている LPS による IL-12 の産生増強による Th1 型細胞の IFN- $\gamma$  の産生誘導を明確にすることができた。また、TLR-2 を介してマクロファージを刺激することが知られている乳酸

菌(10 μg/ml)は、両系統の脾臓細胞で IL-12 と IFN-γ の産生をともに増強した(図 5)。

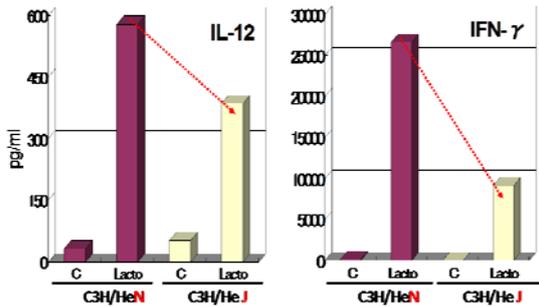


図 5. C3H/HeN と C3H/HeJ 系マウス脾臓細胞での乳酸菌(10 μg/ml)による IL-12 と IFN-γ の産生誘導. C:無処理, Lacto: 乳酸菌

(5) マクロファージ様培養細胞での IL-12 の産生誘導における LPS との相互作用: マクロファージ細胞表面の TLR-4 を介する LPS と TLR-2 を介する乳酸菌は刺激する受容体が異なるので IL-12 の産生増強は相乗的な誘導効果が予想される。ポルフィランが刺激する受容体を推定するため LPS との相互作用を検討した(図 6)。その結果、LPS (0.1 μg/ml) で刺激したマクロファージ様細胞にポルフィランあるいは乳酸菌死菌体(10 μg/ml)を加えると、IL-12 産生の相乗効果が乳酸菌には認められたが、ポルフィランには認められなかった。したがって、ポルフィランは LPS と同様にマクロファージ上の TLR-4 を通じて免疫系を賦活化していることが示唆された。

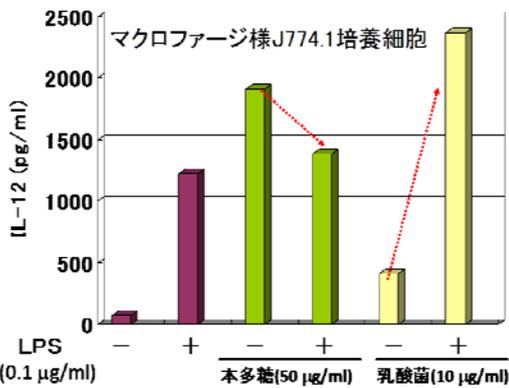


図 6. マクロファージ様培養細胞での IL-12 の産生誘導における LPS との相互作用. 本多糖: ポルフィラン

(6) ヒト腸管上皮様細胞株での抗炎症作用: 腸管での炎症は、腸上皮細胞下にある免疫細胞の過剰反応によって起こるばかりでなく、日常の酸化ストレス等の要因によっても起こるので、その抑制は健康維持としては重要である。ヒト小腸上皮モデルとなる Caco-2 細胞は単層を形成し、微絨毛を持つ小腸上皮様に分化して細胞間を繋ぎとめる密

着結合(TJ)を形成する(図 7)。この結合状態の変化は経上皮電気抵抗(TER)を測定することで行うことができる(図 8)。実際、図 9 に示されるように、培養開始後、培養液を基本的に 3 日毎に交換しながら 17 日培養した Caco-2 の細胞間の密着結合の程度を TER で測定した結果、培養 2 週間後には細胞培養液の対照値の約 5 倍の値となった。

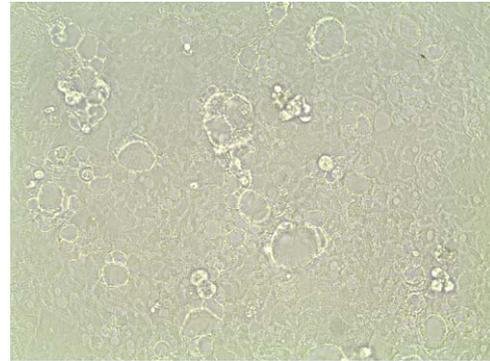


図 7. ヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2

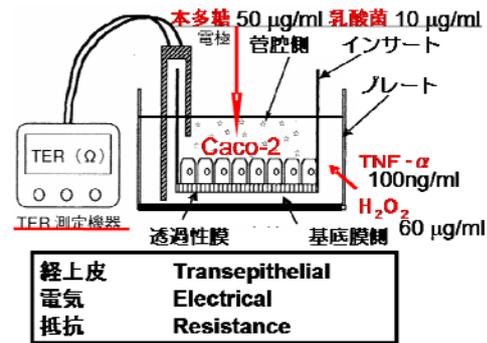


図 8. Caco-2 細胞の培養方法と経上皮電気抵抗測定の概略ならびに抗炎症作用の実験方法

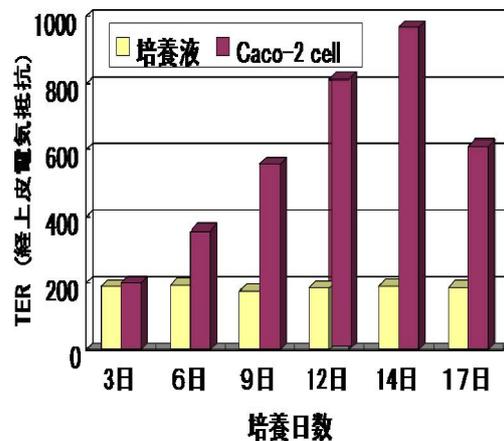


図 9. Caco-2 細胞の培養における経上皮電気抵抗の経時的変化。

ポルフィランと乳酸菌死菌菌体の抗炎症作用を図8に示した実験系で検討した。TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g/ml)あるいは過酸化水素(60  $\mu$ g/ml)で基底膜側から刺激したCaco-2細胞で管腔側(細胞外)に産生増強される炎症性サイトカインであるIL-8の産生をポルフィラン(50  $\mu$ g/ml)と乳酸菌死菌菌体(10  $\mu$ g/ml)は抑制し(図10下図)、TERで測定した腸管のバリア損傷に対する抑制効果もポルフィランに認められた(図10上図)。以上のことから、ポルフィランには免疫賦活化作用と腸管細胞での抗炎症作用といった乳酸菌と同様な健康機能効果があると考えられた。

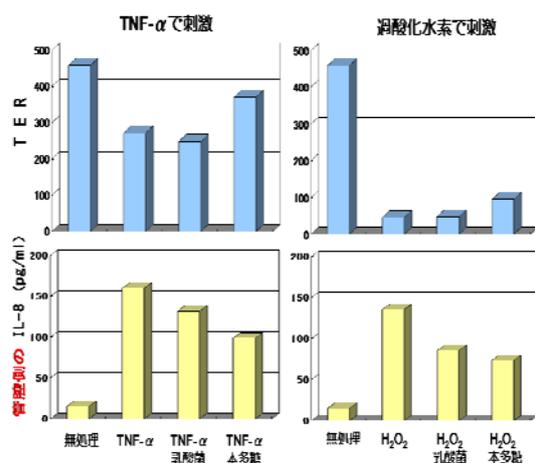


図10. Caco-2細胞でのポルフィランと過酸化水素によるIL-8産生とTERの影響。本多糖：ポルフィラン、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>：過酸化水素

(7) まとめと意義：ヒトの免疫力は20代でピークを迎えるが、加齢とともに胸腺が萎縮して、40代では半減して70代ともなるとピーク時の10%程度しかなくなると言われ、60代後半から癌による死亡増加に細胞性免疫の低下が関与している。実際、80代以上になると細胞性免疫の弱いヒトの約80%が2年以内に死亡するという研究報告もある。本研究では、廃棄されている色落ち海苔から構造式が明らかで多量に含有するポルフィラン多糖には細胞性免疫力の増強という免疫機能性と酸化ストレスにさらされている腸管での炎症抑制効果があることを明らかにできた。このため、現代社会におけるアレルギー体質に偏った免疫バランスを細胞性免疫力の強化より改善してアレルギー反応を抑制させるばかりでなく、進みつつある高齢化社会においても個々人の細胞性免疫力を高め病気に強い身体をつくり健康で豊かな生活を送ることへの貢献が期待できる。したがっ

て、食物として通常摂取している海苔の中にあるポルフィラン多糖がヒトの予防医学に寄与しているかもしれないという意義は大きいと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

- ① 岡崎勝一郎、遠藤有希子、奥谷康一：色落ち海苔から調製したポルフィラン多糖の免疫調節機能。2010年5月30日。第12回マリンバイオテクノロジー学会。早稲田大学理工学部(東京都)。
- ② 岡崎勝一郎、遠藤有希子、奥谷康一：色落ち海苔から調製したポルフィラン多糖によるマウス脾臓細胞でのサイトカインの産生増強。2010年5月29日。第13回マリンバイオテクノロジー学会。広島大学生物生産学部(東広島市)。
- ③ 岡崎勝一郎、村川春菜、遠藤有希子、奥谷康一：海苔ポルフィラン多糖の免疫賦活化機構と腸管細胞保護作用。第14回マリンバイオテクノロジー学会。2011年5月28日。グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター)(静岡市)。

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：免疫賦活剤

発明者：奥谷 康一、岡崎勝一郎

権利者：シーバイオン、香川大学

種類：特願

番号：2010-171476

出願年月日：2010年7月31日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://suisankaiyo.com/seeds/?cat=10>

(東京海洋大学 水産海洋プラットホームの全国水産海洋研究成果ポスター集)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 勝一郎 (OKAZAKI KATSUICHIRO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60109733