

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：85502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850099

研究課題名(和文) フロロタンニンを中心とした低利用食用褐藻成分の抗アレルギーに関する食品機能性研究

研究課題名(英文) Anti-allergic effects of seaweed polyphenols, namely phlorotannin, from edible brown algae which is little-used.

研究代表者

杉浦 義正 (Sugiura, Yoshimasa)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・准教授

研究者番号：60608107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サガメ脂溶性画分から有効成分としてフタル酸ビス(2-エチルヘキシル)が単離・同定された。腸管モデル細胞のCaco-2細胞を用いて透過を確認したところ、透過率は褐藻抽出物で3～17%程度、精製フロロタンニン2種で約30%であった。フロロタンニン(Pt)は花粉症モデル、食物アレルギーモデルに対してともに有効性を示し、その効果は免疫調節に起因していることが示唆された。さらに、Ptの脱顆粒抑制機序を調べるため、プロテインキナーゼC発現に対する影響を調べたが、抑制は認められなかった。また、フコキサンチンにも、in vivo、in vitro試験いずれにおいても、抗アレルギー性が確認された。

研究成果の概要(英文)：From a lipophilic fraction of *Eisenia arborea* extract, bis(2-ethylhexyl) phthalate was isolated and identified as an active compound. Four brown algal extracts and 2 purified phlorotannins had permeated Caco-2 cells, and the permeation ratios were 3-17% and about 30%, respectively. Condensed phlorotannin (Pt) exerted anti-allergic effect on pollen allergy and food allergy model mice. The mechanism would attribute to immunomodulating activity of Pt. To investigate anti-degranulation effect of Pt on mast cells, the effect of it on expression of protein kinase C (PKC) in RBL-2H3 cells was measured by western blot method. But, the suppression of Pt on PKC protein expression was not observed. Moreover, in vivo and in vitro experiments, fucoxanthin that is a marine carotenoid indicated anti-allergic effects.

研究分野：食品機能学

キーワード：褐藻 アレルギー 生理活性 食品機能 水産化学

1. 研究開始当初の背景

海藻ポリフェノール(フロロタンニン)はクロメ、サガラメ、ツルアラメなど低利用食用褐藻類に約3%含まれており、新規機能性成分として注目が高まっていた。その食品機能性は、我々が2006年に抗アレルギー性を報告(Sugiura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 2807, 2006.)して以来、他国(韓国等)の研究グループも含め、糖尿病合併症予防や抗肥満、免疫調節、酸化ストレス抑制効果など多岐にわたって報告(Kim SK, "Handbook of Marine Macroalgae," ed. John Wiley & Sons, 2012.)されるようになり、陸上農産物由来のポリフェノール(フラボノイドやカテキン類など)と同じく、機能性研究が活性化してきた。

この中で、我々は、国民の約半数が何らかの症状を持つといわれ、社会的問題となっているアレルギーに着目し、主にサガラメ由来のフロロタンニンや抽出物の抗アレルギー・抗炎症効果について研究を進めてきた。その結果、加工品における残存活性を含め、多くの知見を得た(杉浦ら, 食品・食品添加物研究誌, 216, 46, 2011.)。

その他、サガラメのメタノール/クロロホルム(M/C)抽出脂溶性画分が、炎症関連酵素(リポキシゲナーゼ; LOX)の活性阻害やマウス耳介浮腫抑制(抗炎症)を示し、その有効成分は dieckol (フロロタンニンの1種)であることを突き止めた。一方、フロロタンニン粗抽出物)による Caco-2 細胞(腸管吸収モデル)透過実験では、フロロタンニン(eckol)の5%程度が透過されることが分かった。サガラメ以外のクロメ(Sugiura et al., Food Agric Immunol., 26, 181, 2015)やツルアラメ(Sugiura et al., Food Sci. Technol. Res., 18, 467, 2012.)のフロロタンニン粗抽出物においては、ヒスタミン放出モデル細胞(RBL-2H3)の脱顆粒抑制作用やアレルギー炎症関連酵素の活性阻害、マウス耳介浮腫抑制効果を見出していた。

しかし、フロロタンニンなど海藻由来成分の抗アレルギー性について、その科学的エビデンスは不十分なため、更に研究を進めた。

2. 研究の目的

低利用食用海藻の付加価値向上を目的として、褐藻サガラメをモデル試料として成分研究および抗アレルギー研究を行った。この研究目的を達成するために、以下の研究を行った。

(1) サガラメ脂溶性画分由来 抗アレルギー成分の単離・同定と有効性試験

dieckol を含まない脂溶性画分にも炎症関連酵素活性の阻害が認められたので、dieckol 以外の有効成分について更に成分分析を進めた。

(2) フロロタンニン類の腸管吸収

Caco-2 細胞を用い、フロロタンニンについて腸管吸収を検討した。また、実験動物を用

いて、フロロタンニンの体内動態も評価した。(3) 食物アレルギー以外の症状に対する有効性の検討がなされていない

食物アレルギーモデルラットに対するサガラメの有効性は報告してきた(Sugiura et al., Fish. Sci., 74, 180, 2008.)が、それ以外の花粉症等のアレルギー症状に対する有効性についても、アレルギーモデル動物を用いて評価した。

(4) 脱顆粒抑制作用の未知のメカニズムを解明

予備検討では、電子顕微鏡観察により、サガラメ抽出物が RBL 細胞脱顆粒にともなう細胞表面骨格の変化を抑制することが見出された。この結果は、既報の抑制メカニズム(Li et al., J. Agric. Food Chem., 56, 12073, 2008.)とは異なっているため、細胞表面骨格の変化に関連する未知の抑制メカニズムの解明について研究を行った。

(5) フロロタンニンの免疫調節作用に関する検討

研究活動スタート支援事業(平成23年~24年度)において、フロロタンニンの免疫調節作用について検討したが、マウス血中の抗体バランスの測定のみで留まっていた。そこで、サイトカインおよび mRNA 発現、T 細胞バランスにおいても影響を及ぼしているかどうか、マウス脾臓において評価した。

(6) フロロタンニン以外の褐藻成分に関する抗アレルギー性の検討

フロロタンニン以外の生理活性物質として、海洋カロテノイドのフコキサンチンについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料調製と成分分析

褐藻試料(クロメ、サガラメ、ツルアラメ、ヒジキ)からメタノール/クロロホルム抽出により水溶性画分(フロロタンニン粗抽出物)および脂溶性画分を回収した。それぞれの画分についてフォーリン-デニス法によりポリフェノール濃度を測定し、フロロタンニン量を確認した。フロロタンニン粗抽出物については、適宜、ODS カラムなどで精製してフロロタンニン純度を高めることにより、フロロタンニン調製物を得た。また、高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどの手法により、内容成分に関する分析、有効成分の推定を実施した。

(2) サガラメ脂溶性成分に含まれる抗アレルギー性成分の単離・同定

シリカゲル分画で得られた、サガラメ脂溶性画分のクロロホルム溶出物にも有効性(リポキシゲナーゼ(LOX)活性阻害によるスクリーニング)が認められているので、順相ゲル(シリカゲル)や逆相ゲル(ODS等)、HPLC 分取等クロマト手法により有効成分の単離・精製を進めた。

(3) フロロタンニン類の腸管吸収の検討

腸管吸収のモデル培養細胞としてヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2) (Peterson and Mooseker, J. Cell Sci., 102, 581-600, 1992.) を使用した実験を行った。既報 (竹山と福島, 学苑・生活科学紀要, 806, 37-39, 2007.) に従ってカルチャーインサートプレート上で Caco-2 細胞を 2 週間増殖させた後、褐藻抽出物および精製フロロタンニンを含む培養上清に切り替えた。フロロタンニンの透過量はフォーリン デニス法や HPLC 法、電気化学検出器 (ECD) - UPLC 分析系で測定することにより評価した。また、フロロタンニンをマウスに経口投与し、経時的に採血した。得られた血清中のフロロタンニン含量を ECD-UPLC 分析系で評価し、経時的な血中濃度変化を解析した。分析試料の調製についても、血清からの成分抽出等について検討を行った。

(4) アレルギーモデルマウスに対する有効性の検討

実験動物としてマウス用い、フロロタンニン粗抽出物を経口投与した。花粉アレルギー (Cry j 1) を腹腔内投与の後、経鼻投与することにより免疫負荷し、アレルギーモデルマウスを作成した。有効性評価は、既報 (Sugiura et al., Fish. Sci., 74, 180-186, 2008.) に従い、血清や脾臓などの生体試料を得て、含まれる免疫グロブリン (IgE) やサイトカイン (インターロイキン) を ELISA 法などで測定することに拠った。また、食物アレルギーモデルは、マウスに卵白アルブミン (OVA) を腹腔内投与することで作成した。そのマウスにおいて、定量的 PCR 法により、サイトカインや T 細胞分化に関わるマスター因子の mRNA 発現量を測定し、フロロタンニンの免疫調節能を調べた。

(5) 脱顆粒抑制作用のメカニズムを解明

予備検討で見出された、RBL-2H3 細胞脱顆粒にともなう細胞骨格変化の抑制は、機序的に IgE レセプター架橋抑制かエキソサイトーシス抑制によるものか不明であった。そこで、電子顕微鏡観察による視覚的なデータ蓄積と合わせ、細胞表面骨格変化に関わる細胞内因子 (PKC 等) について、ウェスタンブロット法等で生化学的に評価した。

(6) フコキサンチンの抗アレルギー性に関する検討

フコキサンチンについて、in vivo 試験として、マウス耳介浮腫による評価を行った。また、in vitro 試験として、RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制試験や炎症関連酵素の活性阻害により有効性を評価した。

4. 研究成果

(1) サガラメ脂溶性画分のクロロホルム抽出物に含まれる有効成分

サガラメ乾燥粉末 1 kg からクロロホルム抽出物 354.8 mg を回収した。そのうち、シリカゲルカラムおよび順相 HPLC で成分の精製を行い、リポキシゲナーゼ (LOX) 活性阻

害を指標に有効成分を探索したところ、2.3 mg の活性成分が得られた。その物質は、¹H および ¹³C-NMR によるスペクトル解析の結果、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP) と同定された (Fig. 1)。LOX 以外の炎症関連酵素 (シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、ホスホリパーゼ A2 (PLA₂)、ヒアルロニダーゼ (HA)) の活性阻害や RBL 細胞の脱顆粒抑制について評価したところ、濃度 100 μg/mL において、脱顆粒抑制以外は抗アレルギー性が確認された (Table 1)。

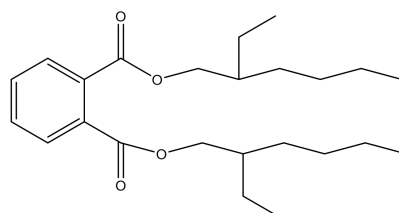


Fig. 1 DEHPの化学構造

Table 1 DEHPによる炎症関連酵素活性の阻害

酵素	PLA ₂	COX-2	LOX	HA
阻害率(%)	40.8 ± 14.9	33.8 ± 2.8	70.0 ± 4.6	12.5 ± 6.7

PLA₂: phospholipase A2, COX-2: cyclooxygenase-2, LOX: lipoxygenase, HA: hyaluronidase

しかし、DEHP は生体に対する内部かく乱物質としても知られており、DEHP 自体やそれを含むサガラメの安全性についても更なる検討が必要と考えられた。

(2) フロロタンニン類の腸管吸収に関する検討

褐藻類のメタノール/クロロホルム (M/C) 抽出物に含まれるポリフェノールについて、Caco-2 細胞の透過量をフォーリンデニス法で調べた。その結果、クロメ、サガラメ、ツルアラメ抽出物で約 3-5% の透過量であった。ヒジキ抽出物については、約 17% 程度の高い透過量であった (Fig. 2)。精製フロロタンニン (eckol と 8,8'-bieckol) について、Caco-2 細胞の透過量を UPLC-UV 検出系で分析したところ、eckol は約 40% が、8,8'-bieckol は eckol に分解されて約 30% が透過することが分かった (Fig. 3, 4)。さらに、UPLC-ECD 分析系にてフロロタンニンの微量分析を試みた。分析条件の検討の結果、移動相: 50 mM リン酸添加 20% アセトニトリル (pH 3.5)、流速: 0.1 mL/min、電極電位: 1200 mV が適用された。上記 2 種のフロロタンニンについて、この分析条件で UPLC-ECD 分析系で微量検出を行ったところ、保持時間 4.0 分で eckol が、5.8 分で 8,8'-bieckol がそれぞれ検出された。検出限界は eckol: 10 nM、8,8'-bieckol: 25 nM であり、HPLC-UV 分析系の約 1000 倍の検出感度であることが分かった (Fig. 5)。この UPLC-ECD 分析系で、Caco-2 細胞の透過液ならびにマウス血清中

のフロロタンニン検出を試みたが、検出は出来なかった。そのため、透過液や血清（血漿）からの分析試料の調製法や、分析条件の更なる検討が必要となった。

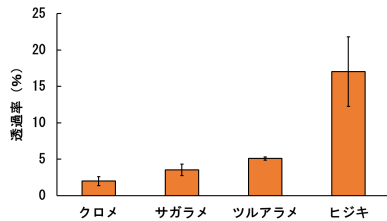


Fig. 2 メタノール/クロロホルム抽出物中のポリフェノールのCaco-2細胞透過率

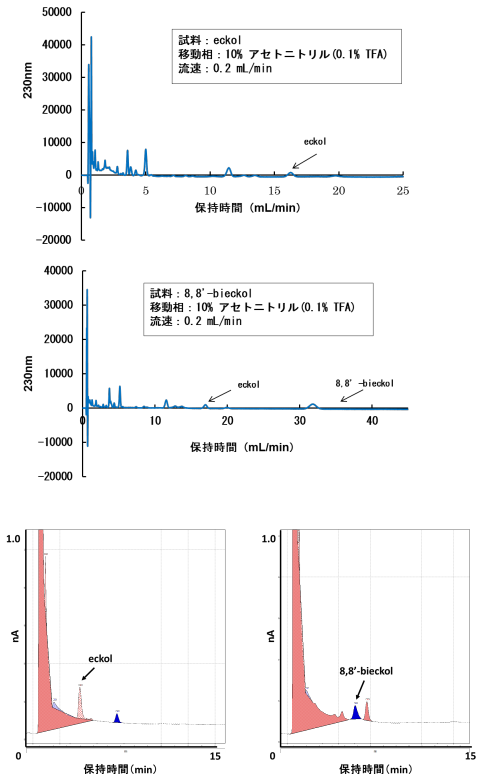


Fig. 5 UPLC-ECD分析系におけるフロロタンニンの微量検出
移動相: 50 mMリン酸30%アセトニトリル (pH 3.5), 流速: 0.1 mL/min, 電極電位: 1200 mV

(3) アレルギーモデルマウスに対するフロロタンニンの有効性の検証

花粉症モデルマウス (Cry j 1 投与) においてフロロタンニン (投与量: 4.5 mg/mouse) は、血中総 IgE 量や脾臓インターロイキン (IL)-4、IL-5 量の有意な低下 (Table 2, 3) を示し、抑制効果の可能性が示唆された。また、食物アレルギーモデルマウス (OVA 投与) については、フロロタンニン (投与量: 同上) は Table 4 に示すような免疫調節を示した。このことから、フロロタンニンは制御性 T 細胞 (iTreg) を誘導し、iTreg 細胞がその他の T 細胞サブセット (Th1 など) の活性化を制御することにより炎症反応を沈静化して抗アレルギー性を示すことが示唆された。

Table 2 フロロタンニンによるくしゃみと鼻掻き回数の抑制

試験区	くしゃみ	鼻掻き
対照	24.8	48.8
フロロタンニン	10.3*	36.0

*: P < 0.05

Table 3 フロロタンニンの花粉症モデルマウスにおける効果

試験区	総IgE (μg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)
対照	13.91	7.98	54.08
フロロタンニン	8.22**	4.42**	8.64**

IL: インターロイキン, **: P < 0.01

Table 4 食物アレルギーマウスにおけるフロロタンニンの免疫調節作用

T細胞	Th1	Th2	Th17	Tfh	Treg
サイトカイン mRNA	IFN-γ	IL-4	IL-5	IL-17	IL-21
タンパク質					TGF-β
マスター因子 mRNA	T-bet	GATA3	ROR t	Batf	Foxp3

*: T細胞分化に與する転写因子, -: 未計測

(4) 脱顆粒抑制メカニズムの解明

フロロタンニンの脱顆粒抑制メカニズムを解明するため、脱顆粒現象と顆粒球の細胞表面移行に關与するプロテインキナーゼ C (PKC) のタンパク質発現量について調べた。RBL 細胞を A23187 で刺激し、フロロタンニン濃縮物を 100 および 200 μg/mL 添加して影響を確認したが、PKC 発現量は何れの濃度でも低下していなかった (Fig. 6)。従って、フロロタンニンによる脱顆粒抑制には PKC は關与していない可能性が考えられた。

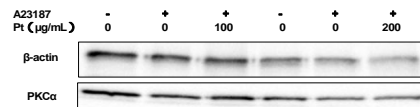


Fig. 6 RBL細胞のPKC タンパク質発現レベルに及ぼすフロロタンニンの影響
A23187: カルシウムイオノフォア (刺激剤), Pt: フロロタンニン濃縮物

(5) フコキサンチンの抗アレルギー性

In vivo 試験では、マウス耳介浮腫抑制試験において、フコキサンチン (Fx) は経皮・経口投与いずれの場合も効果を示した (Table 5)。その機序を調べるために in vitro 試験で、炎症関連酵素の活性阻害を計測した。その結果、Fx、フコキサンチノール (FxoI, Fx 代謝物) とともに LOX 以外の酵素活性を阻害することが分かった (Table 6)。更に、遺伝子レベルでの効果を検証するために、RBL-2H3 細胞をカルシウムイオノフォア (A23187) で刺激した場合の COX-2 mRNA 発現に対する Fx と FxoI の抑制効果を確認したところ、濃度依存的に抑制することが明らかとなった (Fig. 7)。

Table 5 フコキサンチンによるマウス耳介浮腫の抑制

起炎剤		AA	TPA	OXA
抑制率(%)	経皮投与	54.8	68.1	41.4
	経口投与	20.1	25.3	24.1

AA: アラキドン酸, TPA: 12-O-テトラデカルボニルホルボール-13-酢酸エステル, OXA: オキサゾロン, 投与量: 150 nmol/mouse

Table 6 フコキサンチンおよび代謝物による炎症関連酵素活性の阻害

酵素		PLA ₂	COX-2	LOX	HA
50%阻害濃度 (mM)	Fx	0.44	0.28	-	0.41
	Fxol	0.70	0.37	-	0.39

Fx: フコキサンチン, Fxol (Fx代謝物): フコキサンチノール

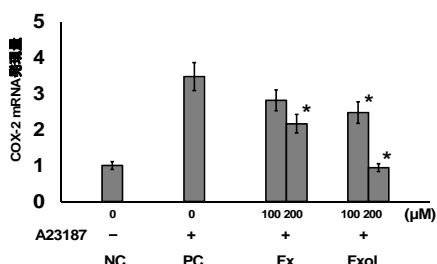


Fig. 7 フコキサンチンおよびフコキサンチノールによるRBL細胞におけるCOX-2 mRNA発現に対する抑制効果
A23187 (カルシウムイオノフォア): 刺激剤, Fx: フコキサンチン, Fxol (Fx代謝物): フコキサンチノール, *: P < 0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

R. Tanaka, N. Nakazawa, T. Maeda, H. Fukushima, R. Wada, Y. Sugiura, T. Matsushita, H. Hatate and Y. Fukuda. Effects of chilled storage, freezing rates, and frozen storage temperature on lipid oxidation in meat blocks from cultured bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *J. Aquat. Food Prod. T.*, 2017, in press.

Y. Sugiura, Y. Kinoshita, M. Abe, N. Murase, R. Tanaka, T. Matsushita, M. Usui, K. Hanaoka and M. Miyata. Suppressive effects of the diethyl ether fraction from a brown alga *Sargassum fusiforme* on allergic and inflammatory reactions. *Fish. Sci.*, 82 (2), 369-377 (2016).

Y. Sugiura, Y. Kinoshita, M. Usui, R. Tanaka, T. Matsushita and M. Miyata. The suppressive effect of a marine carotenoid, fucoxanthin, on mouse ear swelling through regulation of activities and mRNA expression of inflammation-associated enzymes. *Food Sci. Technol. Res.*, 22 (2), 227-234 (2016).

白井将勝, 杉浦義正, 宮崎泰幸. エピアレルゲンの熱安定化機構の理解と調理等に関する迷信の否定. *アレルギーの臨床*, 35 (12), 43-47 (2015).

M. Usui, A. Harada, S. Yasumoto, Y. Sugiura, A. Nishidai, M. Ikarashi, H. Takaba, T. Miyasaki, H. Azakami and M. Kondo. Relationship between the risk for a shrimp allergy and freshness or cooking. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79 (10),

1698-1701 (2015).

田中竜介, 中澤奈穂, 前田俊道, 福島英登, 和田律子, 杉浦義正, 松下映夫, 幡手英雄, 岡野利之, 福田 裕. 冷凍サバ類の冷凍期間および冷凍温度による脂質酸化ならびにアルデヒド類への影響. *日本冷凍空調学会論文集*, 32(1), 39-49 (2015).

Y. Sugiura, K. Nagayama, Y. Kinoshita, R. Tanaka and T. Matsushita. The anti-allergic effect of the ethyl acetate fraction from an *Ecklonia kurome* extract. *Food Agric. Immunol.*, 26(2), 181-193 (2015).

R. Tanaka, K. Shigeta, Y. Sugiura, H. Hatate and T. Matsushita. Accumulation of hydroxyl lipids and 4-hydroxy-2-hexenal in live fish infected with fish diseases. *Lipids*, 49(4), 385-396 (2014).

R. Tanaka, H. Fukushima, T. Maeda, T. Kumazawa, Y. Sugiura, T. Matsushita, H. Hatate and Y. Fukuda. Effect of short-term holding without feeding after capture on reduction in oxidative stress and maintenance of lipid and amino acid contents in *Decapterus maraudsi*. *N. Am. J. Aquacult.*, 75 (4), 562-571(2013).

Y. Sugiura, R. Tanaka, H. Katsuzaki, K. Imai and T. Matsushita. The anti-inflammatory effects of phlorotannins from *Eisenia arborea* on mouse ear edema by inflammatory inducers. *J. Funct. Foods*, 5(4), 2019-2023 (2013).

R. Tanaka, K. Naiki, K. Tsuji, H. Nomata, Y. Sugiura, T. Matsushita and I. Kimura. Effect of ant-oxidative treatments on lipid oxidation in skinless fillet of Pacific saury *Cololabis saira* in frozen-storage. *J. Food Process. Preserv.*, 37(4), 325-334 (2013).

〔学会発表〕(計10件)

杉浦義正, 太田怜吾, 谷口凌佑, 古家圭祐, 白井将勝, 宮田 昌明. スギ花粉症モデルマウスに対するフロロタンニンの抑制効果. *日本農芸化学会 2016 年度大会*, 札幌 (2016).

田中竜介, 中澤奈穂, 前田俊道, 福島英登, 和田律子, 杉浦義正, 松下映夫, 幡手英雄, 福田裕. 養殖クロマグロフィレにおける初期鮮度、凍結速度、保管温度、保管期間による脂質関連物質の変化. *平成27年度日本水産学会秋季大会*, 仙台 (2015).

杉浦義正, 野元つかさ, 布施美保子, 百合野瑛子, 宮田昌明. 褐藻サガラメ由来フロロタンニンによる抗アレルギー性の免疫調節作用. *日本農芸化学会 2015 年度大会*, 岡山 (2015).

百合野瑛子, 布施美保子, 野元つかさ, 杉浦義正, 宮田昌明. ELISA 法による褐藻サガラメ由来フロロタンニン濃縮物の抗アレ

ルギー性の検討．日本農芸化学会中四国支部第 41 回講演会，下関 (2015)．

布施美保子，百合野瑛子，野元つかさ，杉浦義正，宮田昌明．リアルタイム PCR 法による褐藻サガラメ由来フロロタンニン濃縮物の抗アレルギー性の検討．日本農芸化学会中四国支部 第 41 回講演会，下関 (2015)．

杉浦義正．食用海藻の高付加価値化につながる抗アレルギー成分．日本農芸化学会中四国支部 第 41 回講演会ミニシンポジウム，下関 (2015)

杉浦義正，土橋健人，木下佑一，宮田昌明．褐藻サガラメの脂溶性画分に含まれる抗アレルギー成分の探索．平成 26 年度日本水産学会秋季大会，福岡 (2014)．

杉浦義正，田中竜介，松下映夫，宮田昌明．褐藻サガラメ由来フロロタンニンの免疫調節作用．日本農芸化学会 2014 年度大会，川崎 (2014)．

杉浦義正，田中竜介，松下映夫，宮田昌明．In vivo における褐藻サガラメ由来フロロタンニンの抗アレルギー作用．平成 25 年度日本水産学会秋季大会，津 (2013)．

木下佑一，杉浦義正，田中竜介，松下映夫，宮田昌明．海藻ポリフェノールの dieckol による in vivo での抗炎症効果．日本農芸化学会 2013 年度合同広島大会，広島 (2013)．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

アウトリーチ活動：アグリビジネス創出フェア 2015 出展 (平成 27 年 11 月，東京ビッグサイト)

6．研究組織

(1)研究代表者

杉浦 義正 (SUGIURA YOSHIMASA)

独立行政法人 水産大学校・食品科学科・准教授

研究者番号：06068107

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：