

海藻熱水抽出物の J774.1 細胞サイトカイン産生への影響

食品科 長房秀幸

Effects of Hot Water Seaweed Extract on J774.1 Cell Cytokine Production

NAGAFUSA Hideyuki

The components contained in seaweed are known to be physiologically active. In this study, we prepared seaweed extracts and analyzed their physiological activity in cells to develop new methods for using seaweed. As a result, we found that *Gelidium elegans* Kuetzing and *Polyopae polyideoides* promoted the production of Th1 cytokines in J774.1 cells via TLR4. Therefore, it was shown that anti-allergic effects can be expected by improving the subject's immune balance.

Keywords : anti-allergy, cytokine, seaweed, *Gelidium elegans* Kuetzing, *Polyopae polyideoides*

海藻に含まれる成分は様々な生理活性を持つことが知られている。本研究では海藻の新たな利用方法開拓のために、海藻抽出物の作製、細胞を用いた生理活性の検討を行った。その結果、マクサとマタボウは TLR4 を介して J774.1 細胞の Th1 サイトカイン産生を促進し、免疫バランスの改善による抗アレルギー作用が期待できることが明らかとなった。

キーワード：抗アレルギー、サイトカイン、海藻、マクサ、マタボウ

1 はじめに

現代社会において、アレルギーは社会的な課題となっており、国民の約半数は何らかのアレルギー疾患を抱えていると言われる。アレルギー発症の一因として、免疫バランス（Th1、Th2 応答のバランス）の崩れが関係しており、Th2 応答が活性化するとアレルギーが発症する可能性が示唆されている（図 1）¹⁾。一方で、食品による介入でアレルギー症状を抑えられる可能性が明らかになってきている。特に乳酸菌や海藻に含まれる多糖類は、Th1 サイトカインの刺激を介して Th1 応答を活性化し免疫バランスを整えることでアレルギーを抑制する作用を持つことが知られている^{2,3)}。そこで本研究では、免疫バランスの改善による抗アレルギー作用を持つ海藻の探索を目的に、海藻抽出物を用いた細胞試験を行い、サイトカイン産生比を評価することとした。具体的には、駿河湾に生息する海藻から熱水抽出した海藻抽出液を凍結真空乾燥して海藻抽出物を作製し、培地中に各海藻抽出物を同濃度で添加してマクロファージ様細胞の培養を行い、細胞が産生するサイトカイン産

生量を抗体アレイ法によって網羅的に評価することによって、免疫バランスの改善に繋がると考えられる Th1 サイトカインの産生を促進し Th2 サイトカインの産生を促進しない海藻を探索した。さらに、Th1 サイトカインの産生には細胞表面の受容体である TLR4 が関係していると仮説を立て、TLR4 を阻害する実験を行うことで Th1 サイトカイン産生メカニズムを検討した。

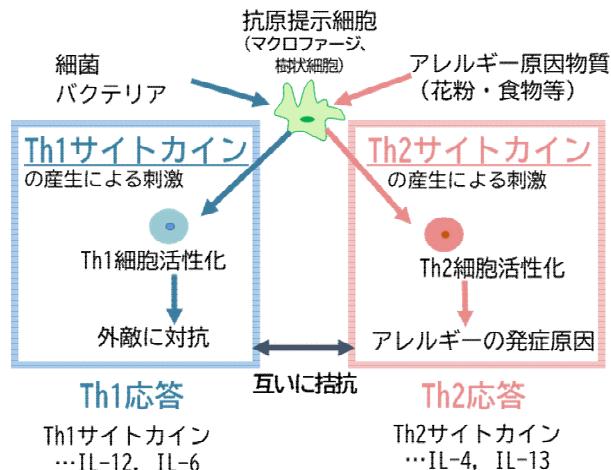


図 1 アレルギー発症と免疫バランスの関係

2 方法

2.1 海藻抽出物の作製

試験に供した海藻サンプルは、静岡県水産・海洋技術研究所の提供を受けた。抽出方法は、家庭での調理にも転用可能であることを期待し、有機溶媒や酸を使わない熱水抽出とした。収集した海藻サンプル（写真）を洗浄後 80°C の熱水中で 1 時間加熱し、濾紙にて粗濾過して海藻抽出液を得た。海藻抽出液を凍結真空乾燥装置 LFD-600DNCS（レイタントライフサイエンス株）で凍結真空乾燥し、乾燥物を作製して海藻抽出物とした。乾燥物は試験まで -80°C で保管し、試験時は温蒸留水に溶解させた後 0.2 μm フィルター（アドバンテック東洋株）を用いて濾過滅菌し、各試験に供した。



写真 収集した海藻サンプル

2.2 Th1/Th2 サイトカイン産生比の測定

細胞はマクロファージ様 J774.1 を用いた。ペニシリントレプトマイシン（富士フィルム和光純薬株）及びウシ胎児血清（Hyclone）を加えた RPMI 培地（Gibco）を用いて、炭酸ガスインキュベーターで培養した。70-80% コンフルエンスに達した細胞を 1×10^6 cells/mL の濃度でマイクロプレートに播種し、1 時間プレインキュベートした後に、終濃度 2 μg/mL となるように海藻抽出物を添加した培地を加え、24 時間培養した後の上清を回収した。上清中のサイトカイン量は抗体アレイ法により定量した。抗体アレイキット（RayBiotech）説明書に従い、上清中の各種サイトカイン産生量を定量した。定量したサイトカインは、IL-12 及び IL-6 産生量の平均を Th1 サイトカイン産生量、IL-4 及び IL-13 産生量の平均を Th2 サイトカイン産生量とし、Th1 サイトカイン産生量を Th2 サイトカイン産生量で除することで Th1/Th2 サイトカイン産生比を計算した。また、予備試験を n=1 で実

施し、Th1 サイトカイン産生量の多かった順に n 数を増やし、サガラメ、マクサ、マタボウ、アカモクについては n=3、ヘラヤハズについては n=2、ワカメ、フクロフノリ、ヒトエグサについては n=1 で実施した。

2.3 Th1 サイトカイン産生メカニズムの評価

細胞の培養は 2.2 と同様に行い、終濃度 10 μg/mL となるように海藻抽出物を添加した培地に TLR4 阻害剤 TAK-242（セレックバイオテック）を終濃度 0.2 μM になるように添加した。24 時間培養した後の上清を回収した。上清中のサイトカイン量は ELISA 法により定量した。Mouse IL-12p40 ELISA kit（eBioscience）の説明書に従い、上清中の IL-12 濃度を定量した。

3 結果

3.1 海藻抽出物の作製

作製した海藻抽出物の収量について表 1 に示す。10.0～40.3g の原料から 0.1～2.8g の海藻抽出物が得られた。収率は海藻ごとに大きく異なっており、ヒトエグサ、マクサは高収率、ワカメは低収率であった。

表 1 海藻抽出物の収量

種類 名	紅藻			褐藻				緑藻
	マク サ	フク ロフ ノリ	マタ ボウ	ヘラ ヤハ ズ	サガ ラメ	アカ モク	ワカ メ	ヒト エグ サ
湿重量 (g)	10.0	20.1	21.0	20.0	27.5	30.0	40.3	10.0
収量 (g)	1.8	1.6	1.6	0.1 ※飛散	2.8	2.5	0.4	2.7
収率 (%)	18.0	7.9	7.6	-	10.1	8.3	1.0	27.0

3.2 Th1/Th2 サイトカイン産生比

Th1/Th2 サイトカイン産生比が大きい順に並べた結果を表 2 に示す。マクサ、マタボウの順に Th1/Th2 サイトカインの産生比が大きく、免疫バランス改善作用が期待できることが分かった。

表2 Th1/Th2 サイトカインの産生比

マクサ	マタボウ	サガラ	ヒトエ	ヘラヤ	アカモ	ワカメ	フクロフノリ
3.87	1.82	1.17	1.07	1.01	1.00	0.94	0.66

←Th1 優位

Th2 優位→

3.3 サイトカイン産生メカニズムの評価

サイトカインの産生メカニズムを評価するためには、マクロファージ表面の受容体である TLR4 阻害剤を用いた評価を行った結果を図2に示す。マクサ、マタボウはいずれも、3.2の結果と一致して単独では主要な Th1 サイトカインである IL-12 の産生を促進し、TLR4 阻害剤の添加によって IL-12 の産生は抑制された。

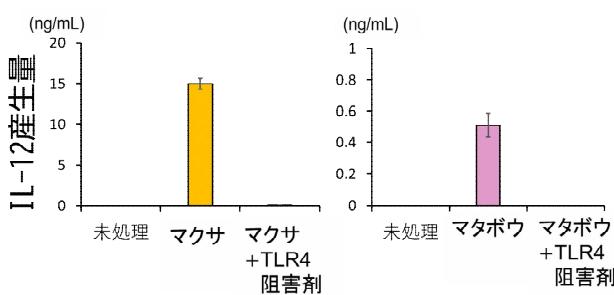


図2 TLR4 阻害剤による IL-12 産生量の変化

4 考察

本研究では、駿河湾の海藻から抗アレルギー作用を有する可能性のあるものを探索するために、各種の試験を実施した。同条件で抽出を実施したにもかかわらず、各海藻サンプルから得られた抽出物の収量や Th1/Th2 サイトカイン産生比は大きく異なっていた。海藻には様々な成分が含まれ、海藻種によって異なった含有割合であることが報告されている³⁾。本研究でも、海藻原料に含まれる成分がそれぞれ異なっていたため、異なる生理活性を示したと考えられる。

マクサ及びマタボウについては、Th1 サイトカインの産生を促進し、そのメカニズムは細胞表面受容体の TLR4 を介していることが明らかとなった(図2)。海藻に含まれる色素成分や多糖類は、TLR4 を介して細胞を活性化させることが報告されており^{4,5)}、マクサやマタボウに含まれるこれらの成分が Th1 サイトカイン産生作用を示した可能性がある。しかし、これらの色素成分や多糖類が

マクサやマタボウ抽出物に特異的に含まれるかは明確ではないため、今後は Th1 サイトカイン産生を促進する原因物質について探索していく必要がある。

5まとめ

海藻には様々な生理活性を有する成分が含まれていることが既に知られている。本研究では、免疫バランスの改善による抗アレルギー作用を持つ海藻の探索を目的とし、8種類の海藻から得られた抽出物の生理活性を、細胞実験を通じて評価した。その結果、本研究で評価した範囲ではマクサとマタボウという海藻種が、他の海藻よりも Th1/Th2 サイトカインの産生比が高値を示し、TLR4 を経由して J774.1 細胞における Th1 サイトカインの産生を促進することが判明した。これにより、今回評価を行った8種類の海藻では、マクサとマタボウが免疫バランスを改善し、抗アレルギー効果をもたらす可能性が示唆された。

謝辞

本研究はクラウドファンディング「目指せ！駿河湾の海藻でアレルギー改善」によって実施されました。また、海藻サンプル収集は静岡県水産・海洋技術研究所開発加工科（現水産振興課）二村和視上席研究員にご協力いただきました。衷心より感謝申し上げます。

参考文献

- 成内秀雄: T 細胞亜集団 Th1, Th2 とアレルギー. アレルギー, 47(6), 570-572 (1998).
- 志田寛: Lactobacillus casei YIT 9029 (乳酸菌シロタ株) のアレルギー抑制効果: 作用機序と臨床応用への可能性. 日本乳酸菌学会誌, 21(2), 107-111 (2010) .
- 野村篤志 他: 多糖類含有抽出成分の抗アレルギー効果について. 金城学院大学論集自然科学編, 4(1), 20-24 (2007) .
- Teruya T, et al. : Structural characteristics and in vitro macrophage activation of acetyl fucoidan from Cladosiphon okamuranus. Glycoconjugate journal, 26, 1019-1028 (2009).
- Wang C, et al. : Immunomodulatory activity of R-

phycoerythrin from *Porphyra haitanensis* via
TLR4/NF-κB-dependent immunocyte
differentiation. *Food & Function*, 11(3), 2173-2185
(2020).