＜令和 4 年度助成＞

色落ちノリ由来ポルフィランの食物アレルギー予防効果

上野　幹憲
（長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科）

緒　言

スサビノリ（*Neopyropia yezoensis*）は一般的に食べられている板ノリの原料であり、我が国を代表とする海藻である。有明海や瀬戸内海などで養殖され、ノリ類の収穫量は 23.2 万トンであり、ワカメ類（4.7 万トン）やコンブ類（1.5 万トン）よりも多い[1)]。近年、河川からの栄養塩不足や珪藻類などの赤潮により色落ちノリが頻発している。色落ちノリは色調や風味の劣化により商品価値が無く廃棄されており、色落ちノリの有効活用が望まれている。申請者はスサビノリに含まれるポルフィランに着目した。ポルフィランはガラクトースを主体とする硫酸化多糖体であり、一般的には水溶性食物繊維である。ヒトはポルフィラン分解酵素を持たないが、ヒト腸内細菌からポルフィラン分解酵素が分離・同定されており、食生活によってポルフィラン分解酵素を有する腸内細菌を定着させることができると報告されている[2, 3)]。色落ちノリ由来のポルフィランは抗酸化作用[4)]、抗炎症作用[4, 5)]を有しており、色落ちノリの有効活用の可能性が見出されている。

食物アレルギーは特定のアレルゲン物質を含む食物によって引き起こされるアレルギー反応があらわれる疾患であり、乳児から成人まで幅広い年齢で発症するが、特に乳児に多い[6)]。食品表示法でアレルゲン物質の表示が義務付けられているが、アレルゲン物質が混入あるいは誤って摂取する可能性を否定できない。重篤な食物アレルギー症状は命にかかわるため、食物アレルギーを緩和するような予防法が必要である。本研究では、色落ちノリポルフィランの抗炎症作用に着目して、食物アレルギー予防効果を検討した。

材料および方法

実験試料

色落ちノリは佐賀県有明海漁業協同組合より譲渡いただいた。ポルフィランは既報[4)]の方法で抽出した。β- ポルフィラナーゼ 16B は nzytech 社製より購入した。色落ちノリ由来ポルフィランを 1 μg/mL ポルフィラナーゼで 24 時間処理し、低分子化ポルフィランを得た。

ポルフィランの化学構造解析

色落ちノリ由来ポルフィランおよび酵素分解ポルフィランを単糖組成解析ならびに分子量測定を行った。

細胞実験

色落ちノリ由来ポルフィランの抗炎症作用を確認するため、LPS 刺激 RAW264.7 の一酸化窒素（NO）放出を Griess 法により検討した。RAW264.7 細胞を各ポルフィランで 1 時間前処理した。その後、LPS（終濃度 100 ng/mL）を添加し、24 時間培養した。培養上清を Griess 試薬と反応させて、吸光度を測定し、検量線から NO 放出量を算出した。

動物実験

BALB/c（6 週令、♀）を 1 週間馴化後、卵白オボアルブミン（OVA）を水酸化アルミニウムとともに腹腔内投与した。ポルフィランあるいは酵素分解ポルフィランを蒸留水に溶解（終濃度 2%）させ、自

由飲水させた。2 週間後、2 回目の OVA を腹腔内投与し、1 % OVA を含む餌を自由摂取させた。2 週間後にマウス血漿を回収し、OVA-IgE と IL-4、IL-5 を ELISA で測定した。脾臓も摘出し、リアルタイム PCR に供した。長崎大学動物実験規則（承認番号：第 2310061901 号）ならびに動物の愛護及び管理に関する法律に従って実験を行った。

結　果

これまでの研究で、色落ちノリ由来ポルフィランは抗炎症作用を示すが、今回抽出したポルフィランに抗炎症作用を観察できなかった。既報ポルフィランの平均分子量は 30,000 である一方で、本研究で得られたポルフィランの平均分子量は 120,000 であった。本研究と既報で使用した色落ちノリの状態が異なることでポルフィランの化学組成に影響すると考えられた。ポルフィランを酸加水分解やラジカル分解によって抗炎症作用を高められることも見出している [4, 7]。そこで、酸加水分解、ラジカル分解、酵素分解により低分子化ポルフィランを調製し、再度抗炎症作用を検討した。どの低分子化ポルフィランも LPS 刺激 RAW264.7 細胞からの NO 放出を抑制することを確認した。ポルフィランはヒト腸内細菌により分解されることから、酵素分解ポルフィランを採用し、動物実験に供した。

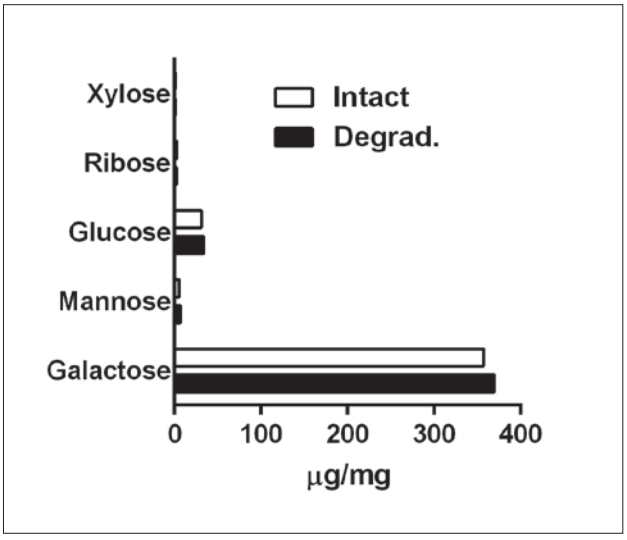

図 1　ポルフィラン 1 mg に含まれる構成糖（μg）

得られたポルフィランの単糖組成解析ならびに分子量測定を行った。酵素分解前と後で単糖組成に大きな違いはなかった（**図 1**）。酵素分解前のポルフィランの平均分子量は 120,000 であったが、酵素分解後では 5,000 と低分子化を確認した。酵素分解によって、単糖組成に大きな影響を与えることなく、ポルフィランを低分子化することができた。

実験期間内でマウスの体重に大きな変化は観察されなかった。OVA 投与マウスでは高い OVA-IgE 量が観察された一方で、酵素分解前ポルフィラン（Intact）と酵素分解後（Degrad.）では有意な減少は見られなかった。IL-4 と IL-5 では、Intact のみ減少傾向にあった（**図 2**）。脾臓においては、OVA 投与マウスで *Il-4* と *Il-5* の発現が上昇したことを観察した。Intact でのみ *Il-4* と *Il-5* の発現が減少傾向にあり、Degrad. では効果が無かった（**図 3**）。

考　察

今回使用した色落ちノリから抽出したポルフィランに抗炎症作用は観察されなかった。既報で使用された色落ちノリは色落ちの度合がひどかったことから、低分子のポルフィランが得られたと推察された。一方、本研究で使用した色落ちノリは入札にかけられた無札ノリであり、品質的に極端に劣化したものでなかったため、比較的高分子のポルフィランが得られた。そのため、同じ色落ちノリでも色落ちの度合いによって得られるポルフィランの分子量と構成糖が変化すると考えられた。板ノリの保存には湿気を抑えることや遮光することが重要であり、保存の状態によって板ノリに含まれるポルフィランの単糖組成や分子量に大きな影響を与えられると示唆された。異なる品質の板ノリからポルフィランを抽出して分析を進めている。ポルフィランを酸加水分解やラジカル分解によって抗炎症作用を高められることから [4, 7]、本研究で得られたポルフィランにおいても低分子化することで抗炎症作用を高められるデータを得られた。酵素分解前と後のポルフィランのアレルギーマウスへの効果を検討した。Intact と Degrad.

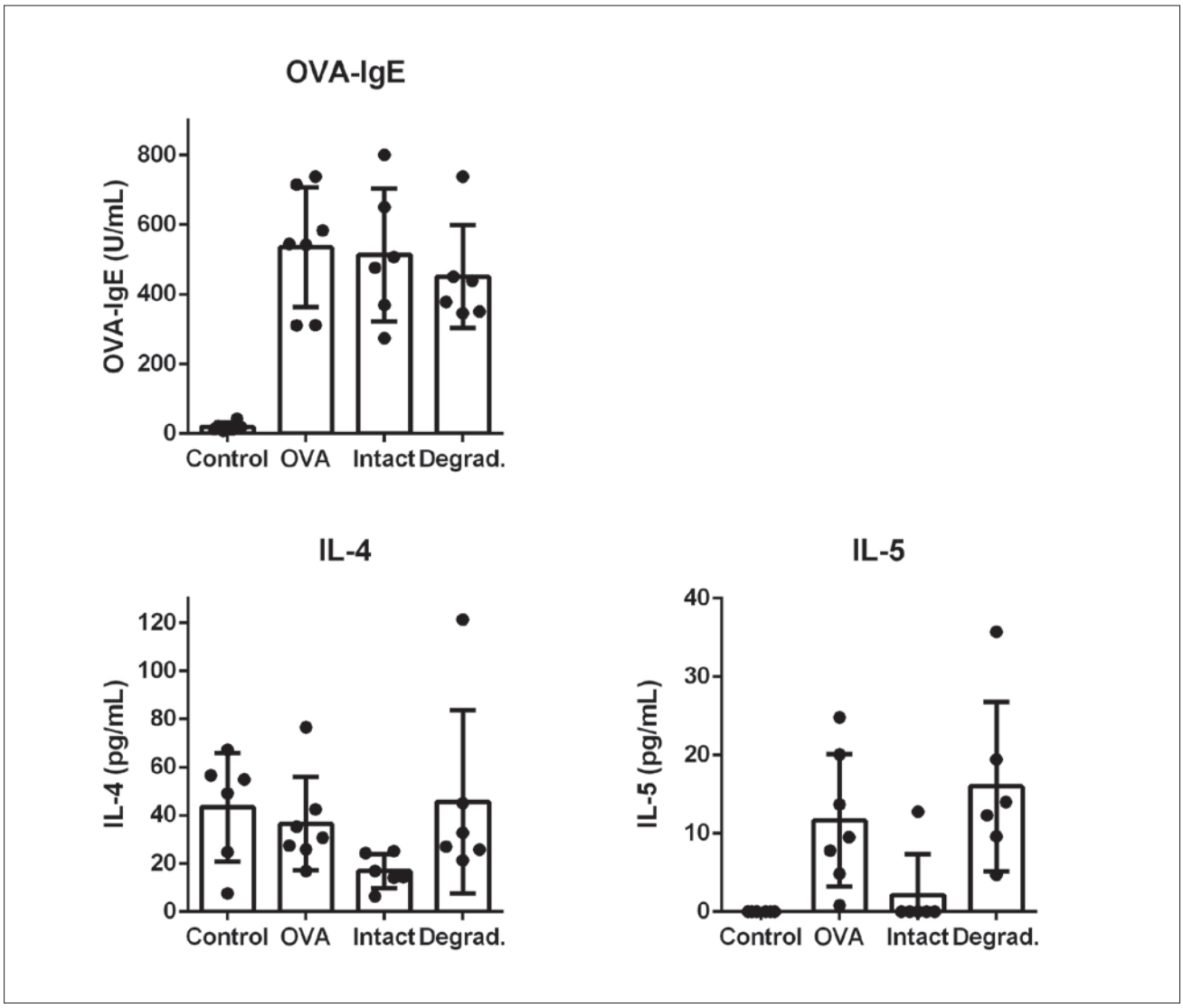

図 2　マウス血漿中 OVA-IgE、IL-4、IL-5 の比較

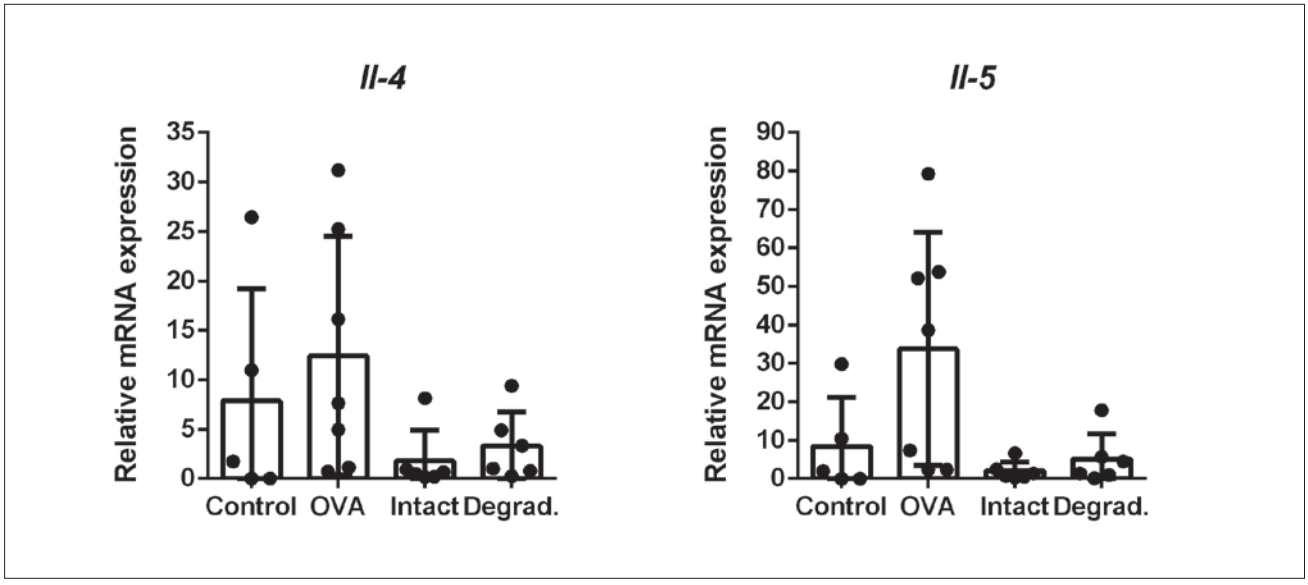

図 3　マウス脾臓における *Il-4* および *Il-5* の遺伝子解析

投与マウスでは、血漿中の OVA-IgE の抑制が観察されなかったが、Intact のみであるが、IL-4 と IL-5 を抑制傾向にあった。加えて、脾臓においても、Intact でのみ *Il-4* および *Il-5* 遺伝子発現を抑制傾向にあった。Th1 細胞と Th2 細胞のバランスが崩れることでアレルギー症状が起こる。IL-4 はナイーブ T 細胞を Th2 細胞に分化させ、Th2 細胞が過剰になるとアレルギー症状を引き起こす。IL-5 は Th2 細胞から分泌され、アレルギー性の炎症部位に好酸球を動員する。Intact がマウス腸内細菌により代謝され、代謝産物が *Il-4* および *Il-5* の遺伝子発現を調節すると示唆された。あるいは Intact が腸管細胞に直接作用しているとも考えられた。本研究では、色落ちノリ由来ポルフィランの明確なアレルギー予防効果を観察できなかったが、ポルフィランが腸管細胞を介して免疫細胞に働きかけていることが示唆された。ポルフィランの腸管細胞や腸内細菌との詳細な相互作用だけでなく、アレルギーに関与するサイトカインや免疫細胞を解析することで、ポルフィランの抗アレルギー作用の可能性を明らかにする。

謝　辞

色落ちノリをご恵与頂きました佐賀県有明海漁業協同組合に心より御礼申し上げます。板ノリの保存方法にご助言頂きました小池海苔店（長崎県長崎市）小池儀重様に御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

1) 農林水産省，令和 4 年海面漁業・養殖業生産量，（https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/gyogyou_seisan/gyogyou_yousyoku/r4/index.html），2024 年 3 月 11 日にアクセス
2) Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. Nature, 464, 908-912, (2010).
3) Shepherd ES, DeLoache WC, Pruss KM, Whitaker WR, Sonnenburg JL. An exclusive metabolic niche enables strain engraftment in the gut microbiota. Nature, 557, 434-438 (2018).
4) Isaka S, Cho K, Nakazono S, Abu R, Ueno M, Kim D, Oda T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored (*Porphyra yezoensis*). Int. J. Biol. Macromol. 74, 68-75, (2015).
5) Nishiguchi T, Cho K, Isaka S, Ueno M, Jin JO, Yamaguchi K, Kim D, Oda T. Protective effect of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*) on lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. Int. J. Biol. Macromol. 93, 1273-1278, (2016).
6) 永田　智　監修．食物アレルギー．病気がみえる vol. 6，株式会社メディックメディア，56-57, 2019
7) Yanagido A, Ueno M, Jiang Z, Cho K, Yamaguchi K, Kim D, Oda T. Increase in anti-inflammatory activities of radical-degraded porphyrans isolated from discolored nori (*Pyropia yezoensis*). Int. J. Biol. Macromol. 117, 78-86, (2018).

Preventive effect of porphyran from discolored nori *Neopyropia yezoensis* on food allergy

Mikinori UENO
Graduate School of Fisheries and Environmental Studies, Nagasaki University

Neopyropia yezoensis, which is an edible red alga, is cultivated and consumed in Japan. In particular, a sheet-like dried sheet foodstuff prepared from *N. yezoensis* is commonly known as “nori,” which is traditionally used in the Japanese cuisine, sushi. Recently, there has been a serious problem regarding the production of discolored nori, which is low-quality and of no commercial value, due to red tide plankton and malnutrition in cultivated sea areas. Discolored nori has a faded color and does not have a good flavor. Porphyran, which is a sulfated polysaccharide isolated from *N. yezoensis*, has several attractive bioactivities. Previous studies have reported that porphyran isolated from discolored nori displayed antioxidant and anti-inflammatory activities. Therefore, in the current study, the preventive effects of porphyran from discolored nori *N. yezoensis* on OVA-induced food allergy was examined. Intact porphyran isolated from discolored nori showed no anti-inflammatory activity, due to its relatively high molecular weight. However, relatively low molecular weight porphyran obtained via enzymatic degradation was subsequently found to show anti-inflammatory activity on nitric oxide in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Both intact porphyran and enzymatic degradation-porphyran intake groups showed no effect on OVA-IgE production in OVA-induced mouse blood plasma. There was a tendency for a decrease in IL-4 and IL-5 in blood plasma and gene expression, respectively in the spleens of only the intact porphyran intake mouse group. Enzymatic degradation porphyran showed no effects on either of these. Porphyran with high molecular weight might be metabolized in microbiota or interact with intestinal cells in the mouse gut that regulate IL-4 and IL-5 gene expression in immune cells. Further study is needed to elucidate the mechanisms of the immunomodulating activity of intact porphyran on food allergy.