

秋季藻類シンポジウム (2005. 11. 30) 「海藻と健康」講演

丸山弘子：海藻と免疫機能 — 特にフコイダンの生理活性 —

1. はじめに

近年、健康への感心が高まるにつれて、低カロリーでビタミン、ミネラル等の成分を多く含んでいる海藻が生活習慣病を予防する食品として注目されている。四方を海で囲まれている日本人は太古の時代から海藻を食しており、これは長寿につながる食習慣として食文化の面からも研究がすすめられ関連性が示唆されている。また、海藻類には陸上の植物には含まれない特有な糖類があり、それらは寒天、カラギナン、アルギン酸、フコイダン等と呼ばれ、とくに医化学分野（遺伝子解析等）や食品として広く利用されている。

フコイダンの生理活性については、ウスイらが1980年にアラメ由来フコイダンの抗腫瘍作用を示すことを報告して以来、各種褐藻由来のフコイダンの抗腫瘍作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗アレルギー作用等について多く報告されている。今回我々は、日本で一般に食されている海藻（ノリ、ヒトエグサ、コンブ、ワカメ等）から抽出された成分が持つ抗腫瘍効果についてと、フコイダンの持つ活性作用について免疫学的観点に絞り最近の知見を紹介したい。

2. 抗腫瘍効果の検索

a. 海藻抽出物の移植腫瘍増殖抑制

山本らは1974年に4種の海藻（ミツイシコンブ、ナガコンブ、リシリコンブ、ホンダワラ）より熱水抽出し、透析した後の透析内液を得て、それが多糖類であることを確認し、この透析内液をマウスの腹腔内に投与すると、皮下移植サルコーマ180(S-180)腫瘍の増殖を抑制することを報告した⁽¹⁾。その後、緑藻（ヒトエグサ）、褐藻（カジメ、アラメ、ヒジキ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、マコンブ、リシリコンブ、ワカメ）、紅藻（アサクサノリ）の10種類の海藻から熱水抽出物と透析内液を得て、抗腫瘍効果についてL-1210白血病細胞を用いて延命率を調べたところ、6種類について効果を認めた⁽²⁾（表1）。また、各種褐藻より抽出したフコイダンがL-1210白血病に対して延命効果を示すことも報告した^(3,4)（表2）。高橋はアラメからフコイダンとラミナランを抽出し有効成分はフコイダンであること、さらにフコイダンに含まれる硫酸基が重要な活性部位であることを報告している⁽⁵⁾（表2）。これらの抗腫瘍効果は、コンブ熱水抽出物、透

表1 食用海藻のL-1210白血病に対する抗腫瘍効果

藻類	抽出物	動物数 (匹)	投与量 (mg/kg/day)	延命率 (%)
ヒトエグサ	熱水抽出物	7	150 x 6	24
	透析内液	5	200 x 6	26
カジメ	熱水抽出物	7	400 x 6	10
	透析内液	7	400 x 6	37
アラメ	熱水抽出物	7	400 x 6	33
	透析内液	7	200 x 6	27
ヒジキ	熱水抽出物	3	400 x 6	10
	透析内液	3	200 x 6	22
ミツイシコンブ	熱水抽出物	3	200 x 6	0
	透析内液	3	200 x 6	0
ナガコンブ	熱水抽出物	3	400 x 6	29
	透析内液	7	200 x 6	25
マコンブ	熱水抽出物	3	400 x 6	14
	透析内液	3	200 x 6	29
リシリコンブ	熱水抽出物	3	400 x 6	10
	透析内液	7	200 x 6	39
ワカメ	熱水抽出物	3	200 x 6	5
	透析内液	3	200 x 6	14
アサクサノリ	熱水抽出物	3	200 x 6	5
	透析内液	4	200 x 6	0

表2 食用褐藻類から抽出した試料のL-1210白血病に対する抗腫瘍効果

褐藻類	抽出物	動物数 (匹)	投与量 (mg/kg/day)	延命率 (%)
ナガコンブ	粗フコイダン	7	100 x 6	40
マコンブ	粗フコイダン	7	200 x 6	22
リシリコンブ	粗フコイダン	7	100 x 6	23
			200 x 6	36
ホソメコンブ	粗フコイダン	7	50 x 6	33
	粗フコイダン	7	100 x 6	38
カジメ	粗フコイダン	7	200 x 6	29
アラメ	粗フコイダン	7	100 x 6	28
	粗フコイダン	7	150 x 6	32
	粗フコイダン	7	200 x 6	39
	精製フコイダン	7	25 x 6	6
	精製フコイダン	7	50 x 6	31
	ラミナラン	7	100 x 6	10

析内液をマウスに経口投与した実験でも効果が認められたことからA⁽⁶⁾、宿主を介した腫瘍抑制効果であることが示唆され、さらにホソメコンブ由来フコイダンを用いた *in vitro* と *in vivo* 実験からも、腫瘍細胞に対する直接的作用によるものではないことが証明された⁽⁴⁾。これまでにフコイダンの作用機序は、(1) ナチュラルキラー (NK) 細胞活性の増強^(5,7)、(2) インターフェロンの産生誘導⁽⁷⁾、(3) アポトーシスの誘導⁽⁸⁾等の機能を活性化することが明らかにされている。

b. フコイダンの腫瘍移植マウスに対する延命効果

フコイダンの抗腫瘍効果における作用機序を免疫学的観点から詳細に検討した。CDF1 マウスに P-388 白血病細胞を移植し、その24時間後からメカブ由来フコイダンを腹腔内に10日間連続投与、もしくは、P-388 白血病細胞の移植4日前からフコイダンを腹腔内投与し、移植後さらに10日間連続投与して生存日数を比較検討した。その結果、移植後投与の場合はフコイダン投与群では平均生存日数12.9日で、対照群では11日であり、移植前からの投与では、フコイダン投与群14日に対して対照群では9.6日であった。これらの結果を延命率で見た場合、前者が17.3%、後者が41.7%の延命率となり、フコイダン投与によりいずれも延命効果が認められた。この実験では、フコイダンの投与開始を腫瘍の移植前から始めた場合で、より顕著に延命効果を示すことが明らかとなった(図1)⁽⁷⁾。これらの結果から、フコイダン投与により生体内の防御機能を賦活化する可能性が示唆された。

c. フコイダンによる非特異的細胞傷害活性 (NK 細胞活性)

フコイダンが免疫系を活性化することは高橋らによって報告されている⁽⁵⁾。さらに、フコイダンは腫瘍細胞に対して直接的な傷害作用が弱いという結果をふまえ、抗腫瘍効果の作用機序を免疫系の賦活化という観点からとらえて、非特異的細胞傷害活性の検索を行った。フコイダン投与マウスの脾臓細胞中のNK細胞活性はYAC-1リンホーマを標的細胞として測定した。この結果は、フコイダン投与群では、対照群に比較して約3倍の活性増強を示した。この結果から、フコイダン投与によりNK細胞活性の増強が示唆され、抗腫瘍効果の作用機序の一つが明確となった(図2)。

d. フコイダンのサイトカイン産生能への影響

免疫応答にはヘルパー1型T (Th1) 細胞とヘルパー2型T (Th2) 細胞が大きく関わっていることが提唱され⁽⁹⁾、そのバランスの在り方が問題となっている。Th1型サイトカインの一つであるインターフェロン (IFN)- γ は腫瘍免疫や感染防御に重要な役割を担っているが、NK細胞活性を増強する因子としても知られている⁽¹⁰⁾。また、同じくTh1型サイトカインであるインターロイキン (IL)-2はT細胞の増殖を促進し、さらにINF- γ と共存して細胞傷害活性を増強させる効果があることが知られている^(11,12)。フコイダン投与によるNK細胞活性の増強はIFN- γ 産生によるものであるか、また同時に、IL-2の相乗作用が生じているかについて検討した。

フコイダン投与マウス脾臓細胞よりT細胞を分離し、固相

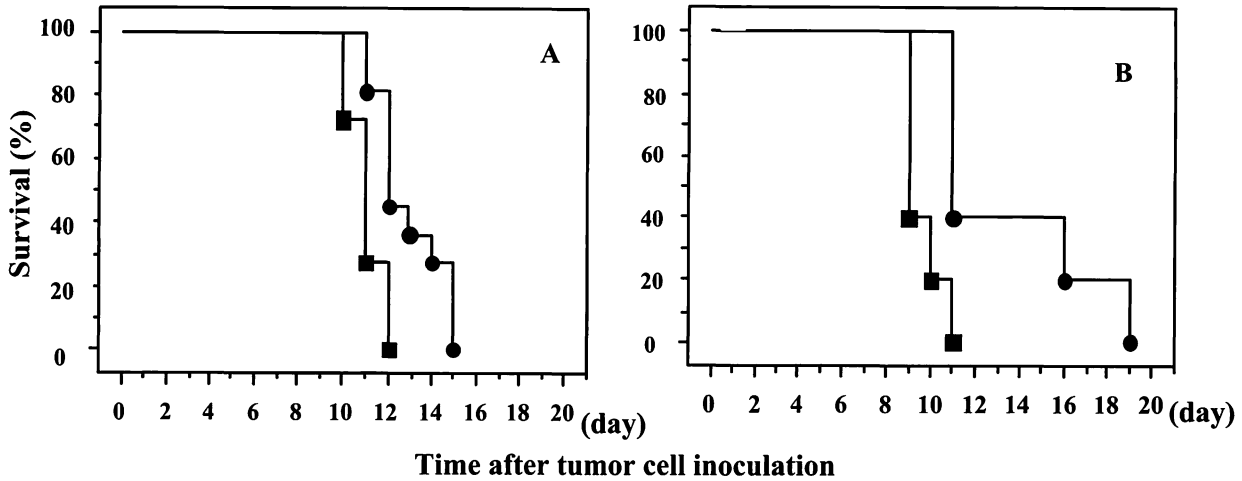


図1 フコイダンのP388白血病細胞移植マウスに対する抗腫瘍効果

- A. CDF1マウスにP388白血病細胞移植後、フコイダンを10日間腹腔内投与した場合の生存率
 - B. CDF1マウスにP388白血病細胞移植4日前からフコイダンを腹腔内投与し、移植後さらに10日間投与を続けた場合の生存率
- ：フコイダン投与群 ■：対照群

化抗CD3抗体で刺激して48時間培養した上清中に産生されたINF- γ とIL-2をELISA法にて測定した。脾臓T細胞より産生されたINF- γ の量はフコイダン投与群では対照群と比較して約2倍産生量が増加していたが、IL-2の産生量は両群間には差は認められなかった(図3)。これらの結果から、フコイダン投与マウスのNK細胞はT細胞から誘導されるINF- γ により活性化され、その結果、移植腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示し、マウスの生存日数が延長したと考えられた。本実験結果から、INF- γ とIL-2による相乗効果による細胞傷害活性の増強は認められず、フコイダンはINF- γ 産生のみを高める作用があることが明らかとなった。さらに、T細胞からINF- γ 産生を促すには、抗原提示細胞からのT細胞へのシグナルが必要であり、そのシグナルとしてIL-12が知られている^(13,14)。そこで、IL-12産生について検討したところ、フコイダン投与群では対照群に比べ約4倍量多く産生されていることが明らかとなった(図4)⁽⁷⁾。

e. フコイダン投与によるNK細胞活性化機序

これらの結果を総括すると、フコイダンの投与により抗原提示細胞(マクロファージ)を活性化してIL-12産生を亢進する。このIL-12がT細胞に作用してINF- γ 産生を誘導し、さらにNK細胞の活性化を促す。活性化したNK細胞は移植腫瘍を傷害し、抗腫瘍効果を示すという作用機序の一部が解明された。これらの事実からフコイダンはTh1型免疫反応を賦活化する作用を有することが明らかとなった。

3. Th2型免疫反応に及ぼす影響

a. マウス卵白アルブミン(OVA)誘発Th2型肺炎症に対する効果

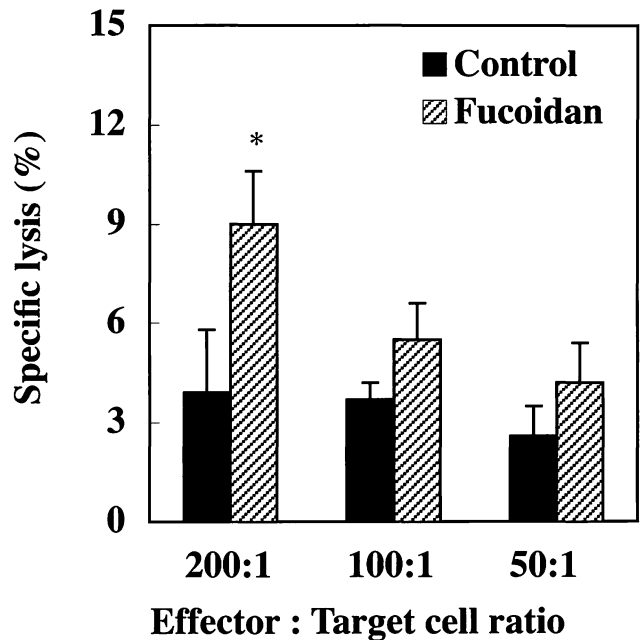


図2 フコイダン投与マウス脾臓細胞中のNK細胞活性

フコイダン4日連続腹腔内投与したCDF1マウス脾臓のNK細胞活性をYAC-1リンホーマを標的細胞として⁵¹Crを用いて測定した。
*p<0.05 (t検定)

Th1 / Th2のバランスパラダイムに基づいて、近年疾患の発症機序を明らかにする試みがなされている。これによるとTh1 / Th2のバランスを改善することが疾患の治療につながるものと考えられる。そこで、これまでフコイダンが

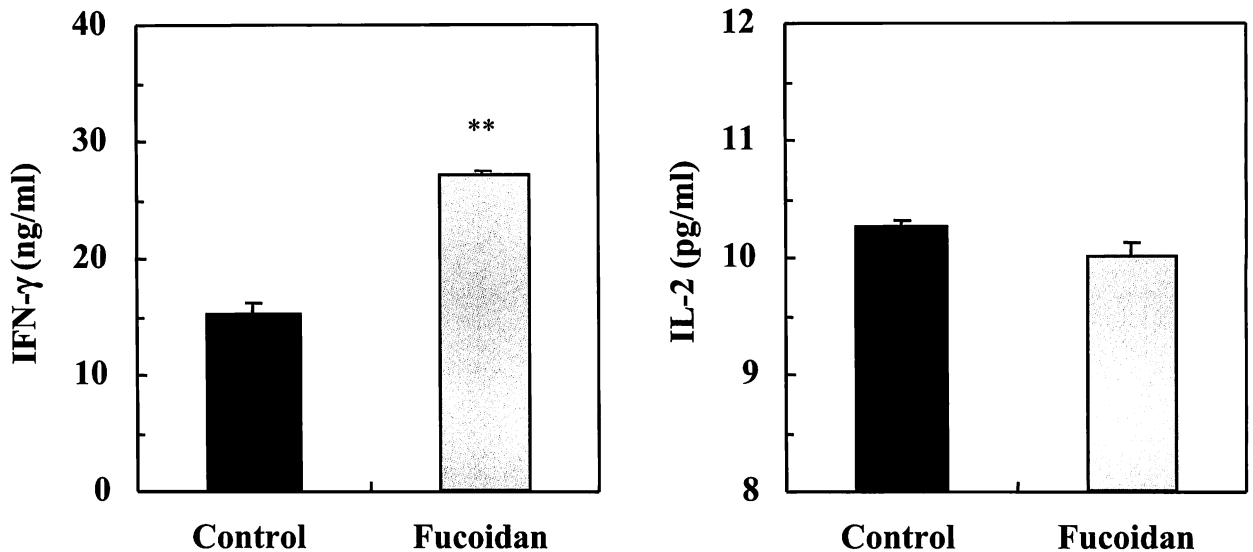


図3 フコイダン投与マウス脾臓T細胞のIFN- γ 及びIL-2産生量の検討

フコイダン4日間連続投与したマウス脾臓よりT細胞を分離精製し、固相化CD3抗体にて刺激して48時間後に産生されるIFN- γ とIL-2の産生量をELISA法にて測定した。** $p < 0.01$ (検定)

Th1型免疫反応誘導体であるならば、Th2型免疫反応に偏った疾患を改善可能であるかをOVA誘発Th2型肺炎症モデルで検討した。

BALB/cマウスにフコイダンを4回連続投与し、フコイダン最終投与翌日と8日後にOVAとアラムで感作を行い、その1週間後から3日間連続で、ネブライザーにてOVAを吸入させた。それらマウスの肺洗浄液(BALF)中のサイトカイン産生量と血清中IgE抗体価及び肺の病理組織学的検索を行った。この結果、フコイダンの投与によりBALF中のTh2型サイトカイン量は対照群に比べ、IL-4産生では約1/2倍に減少し、IL-13産生は約1/19倍に、IL-5は約1/14倍に減少したが、Th1型サイトカインのIFN- γ 産生量は両群間には差は認められなかった(図5)。IL-4とIL-13はIgEの産生や粘液産生に、また、IL-5は好酸球の産生に関与するといわれている^(15,16)。フコイダン投与によりIL-4、IL-13及びIL-5産生量は減少し、IgE産生を抑制すること(図6)、さらに、BALF中好酸球数の減少と(写真1、図7)、肺の病理組織診断から気管支上皮における粘液産生細胞の出現が抑制されることも確認した(写真2、図8)⁽¹⁷⁾。

b. マウス抗原反復刺激アトピー性皮膚炎に対する効果

Th2型免疫反応への偏りにより誘導される、アトピー性皮膚炎マウスを用いてフコイダン投与による改善効果を検討した。BALB/cマウス腹部に2,4,6-trinitro-1-chlorobenzen(TNCB)塗布1週間後から隔日14回反復塗布し、7回目の塗布24時間後からフコイダンを隔日7回投与した。TNCB塗布終了後、耳介にTNCBを感作させ、血清中のサイトカイン産生量、IgE抗体価を解析した。感作6時間後のIFN- γ 産生量はフコイダン投与群では非投与群の約3倍増

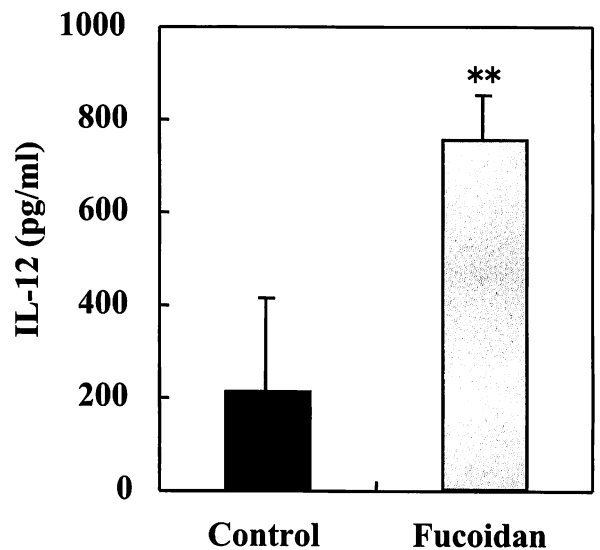


図4 フコイダン投与マウス脾臓細胞からのIL-12産生量の検討

フコイダン4日間連続投与したマウス脾臓細胞を48時間培養後のIL-12産生量をELISA法にて測定した。** $p < 0.01$ (検定)

加していた。またIL-4産生量は両群間では差は認められなかった(図9)。総IgE量はフコイダン群では対照群に比べ約2/3の量に減少している結果であった(図10)。これらの結果から、Th2型免疫反応への偏りにより誘導されるアレルギー疾患はフコイダンの投与により抑制されることが示唆

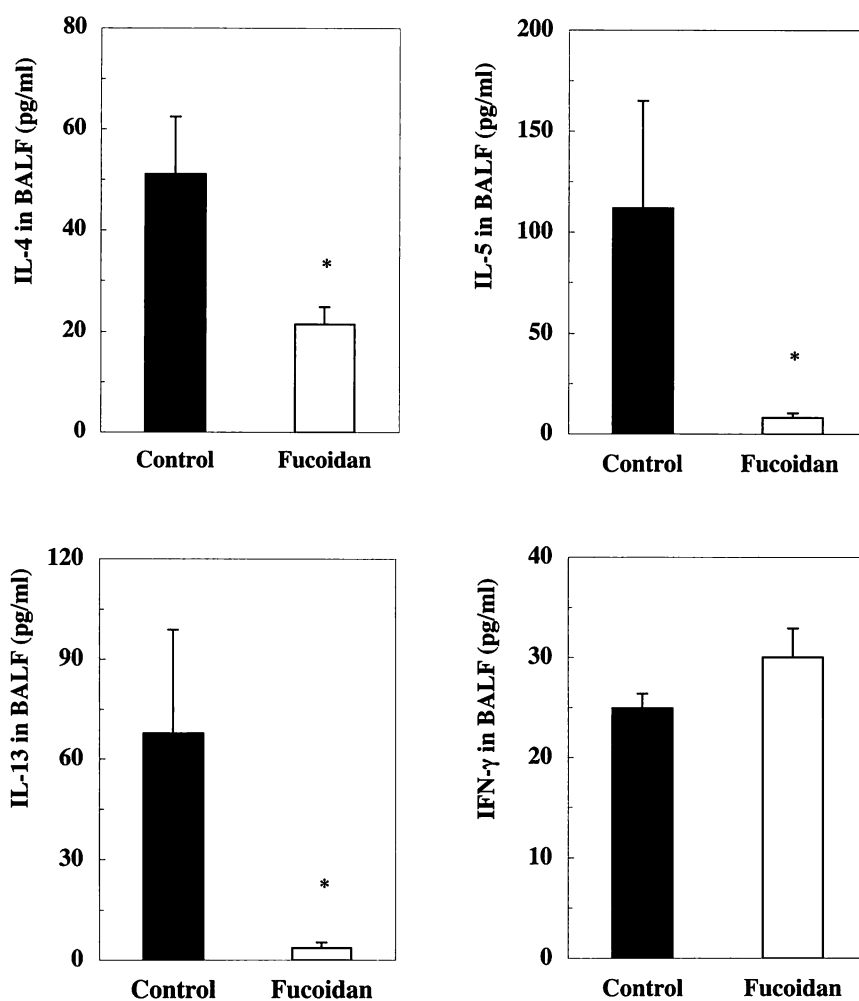


図5 OVA誘発肺炎マウスBALF内IL-4, IL-5及びIFN- γ 産生量の検討

BALB/cマウスにOVA感作4日前からフコイダンを投与し、投与終了1日後と8日後にOVA感作し、さらに7, 8, 9日後、OVAを吸入させ肺炎を誘導した。肺洗浄液 (BALF) 中のサイトカイン産生量をELISA法にて測定した。* $p < 0.05$ (検定)

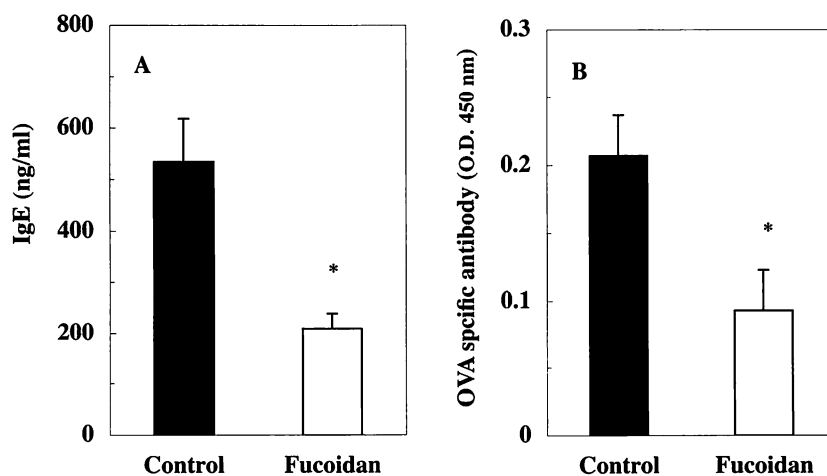


図6 OVA誘発肺炎マウス血清中総IgE及びOVA特異的IgE産生量の検討

OVA誘導肺炎マウス血清中総IgE及びOVA特異的IgE産生量をELISA法にて測定した。* $p < 0.05$ (検定)

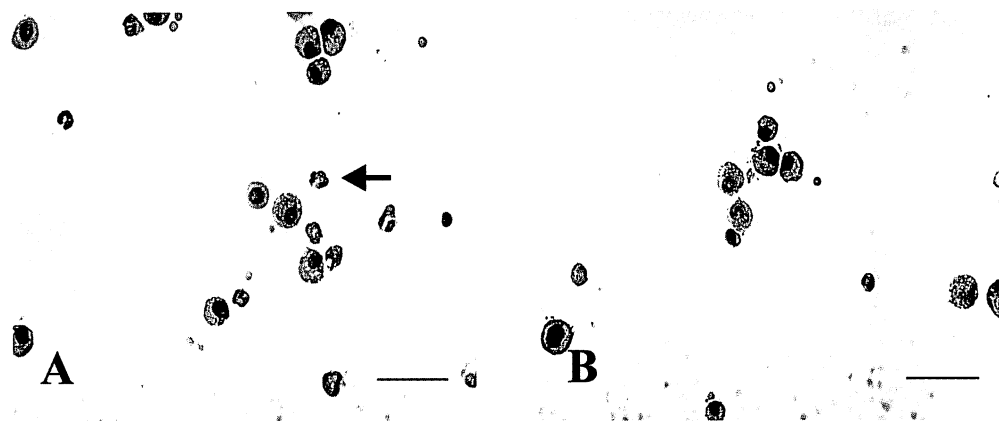


写真1 OVA誘発肺炎マウスBALF内好酸球の誘導
OVA誘導肺炎マウスBALF内細胞をサイトスピんで塗抹後、Diff-Quick染色した。
A. 対照群 B. フコイダン投与群

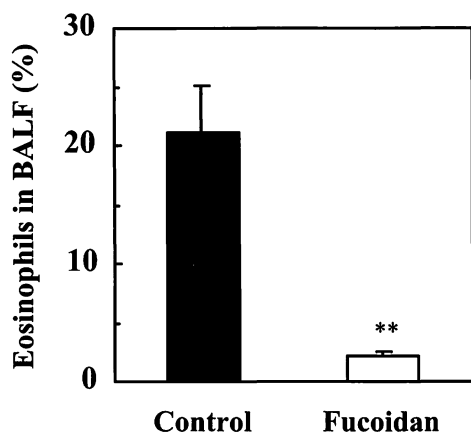


図7 OVA誘発肺炎マウスBALF内好酸球の数
OVA誘導肺炎マウスBALF内細胞をサイトスピんで塗抹後、Diff-Quick染色して
滲出細胞当たりの好酸球数として算定した。** $p < 0.0001$ (t検定)

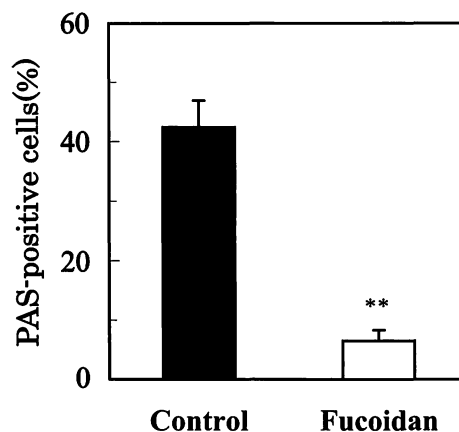


図8 OVA誘発肺炎マウス気管支上皮細胞中粘液産生細胞の数
OVA誘導肺炎マウス気管支上皮の粘液産生細胞当たりのPAS陽性細胞数を算定した。
** $p < 0.0001$ (t検定)

された⁽¹⁸⁾。

フコイダンが他の免疫細胞へ及ぼす影響について調べるために、BALB/cヌードマウスを用い上記と同様の実験法にてTNCB反復刺激を行った。その結果、血清中IFN- γ 産生量はフコイダン投与群で4 pg/ml、対照群は測定不可能であった(図11)。この結果から、フコイダンの投与によりT細胞以外のマクロファージやNK細胞からのIFN- γ 産生を増強する可能性をも示唆された。

4. おわりに

以上の結果から、フコイダンのTh1型免疫反応の賦活化が明らかにされ、癌やアレルギー疾患の予防もしくは治療に有用であることが示唆された。しかし、投与方法及び投与量の違いで生体にどのような影響をもたらすかという問題もあ

ることから、今後フコイダンの免疫系における役割について詳細に検討する必要がある。フコイダンは抗菌作用、抗ウイルス作用等を持つことも知られ、さらに広範囲な研究も行われることを期待したい。

参考文献

- (1) Yamamoto, I., Nagumo, T., Yagi, K., Tominaga, H. & Aoki, M. 1974. Antitumor effect of seaweeds I. Antitumor effect of extracts from *Sargassum* and *Laminaria*. Jp. J. Exp. Med., 44: 543-546.
- (2) Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E. & Maruyama, H. 1982. Antitumor activity of crude extracts from edible marine algae against L-1210 leukemia. Bot. Mar., 25: 455-457.
- (3) Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E., Maruyama H., Mori E. 1984. Antitumor activity of edible marine algae: Effect of

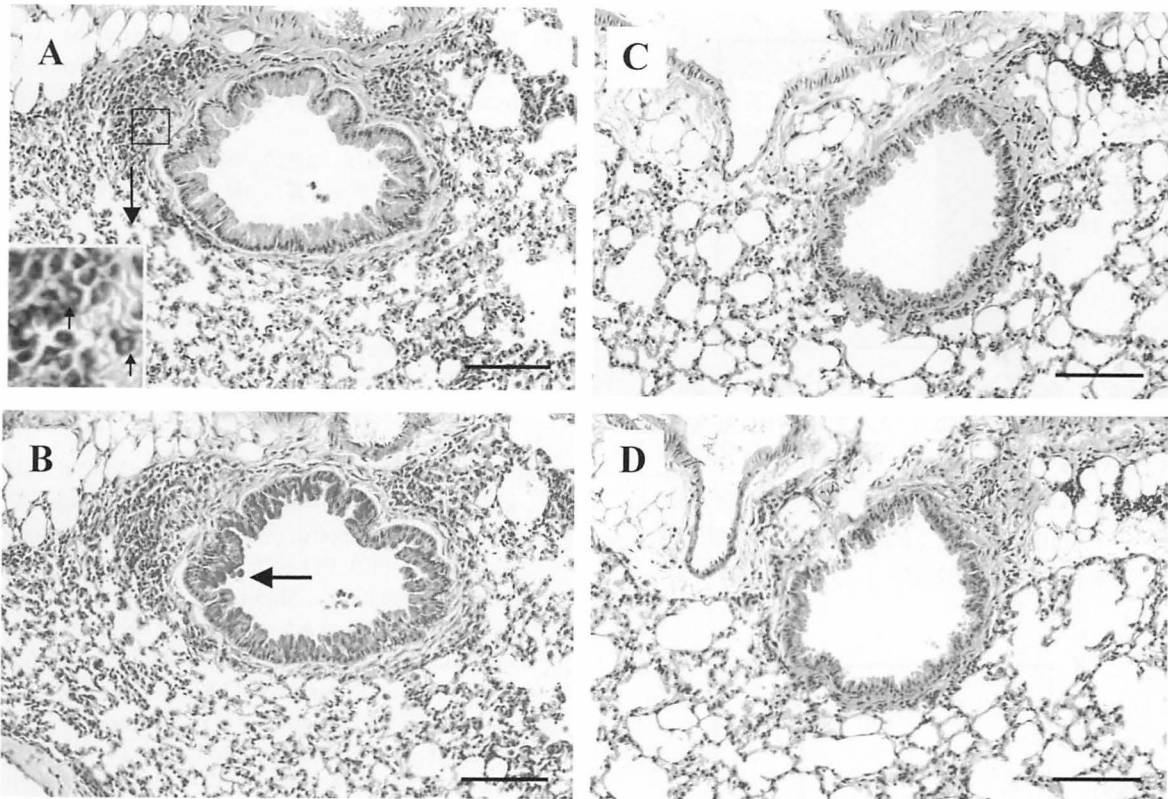


写真2 OVA誘発肺炎マウス肺の病理組織学的観察

OVA誘導肺炎マウス肺のパラフィン切片を作製し、HE染色とPAS染色を行い、炎症性細胞と気管支上皮の粘液産生細胞の出現について観察した。

A) 対照群，肺組織HE染色，矢印は好酸球，C) フコイダン投与群，肺組織HE染色，B) 対照群，肺組織PAS染色，矢印は粘液産生細胞，D) フコイダン投与群，肺組織PAS染色

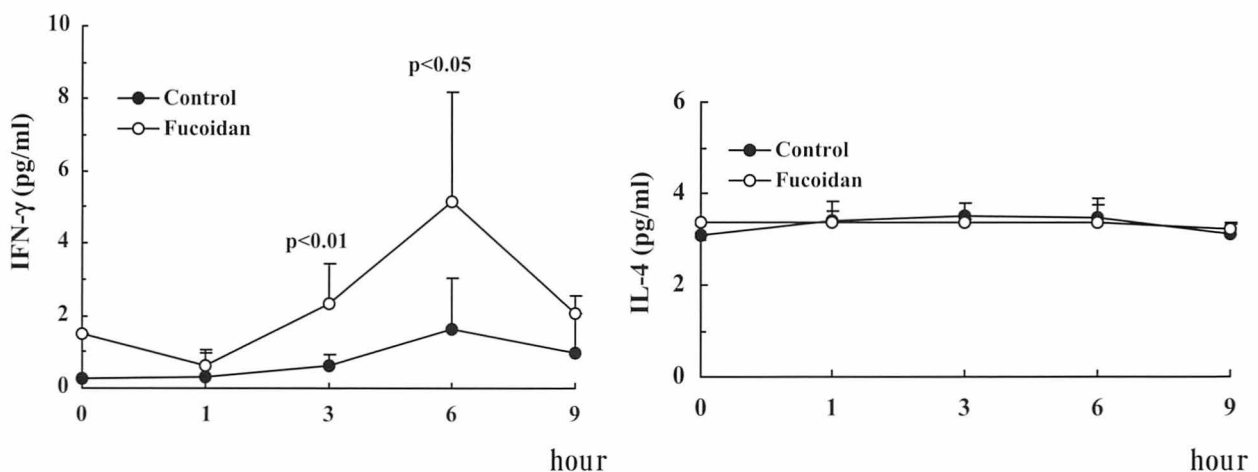


図9 アトピー性皮膚炎マウス血清中IL-4及びIFN- γ 産生量の検討

BALB/cマウスを用いTNCBで抗原反復刺激することによりアトピー性皮膚炎を誘発させ感作終了後，血清中IL-4及びIFN- γ 産生量をELISA法にて測定した。

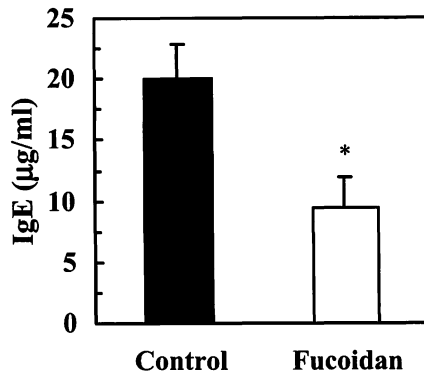


図10 アトピー性皮膚炎マウス血清中総IgE産生量の検討

TNCB誘発アトピー性皮膚炎マウス血清中総IgE産生量をELISA法にて測定した。

* $p < 0.05$ (検定)

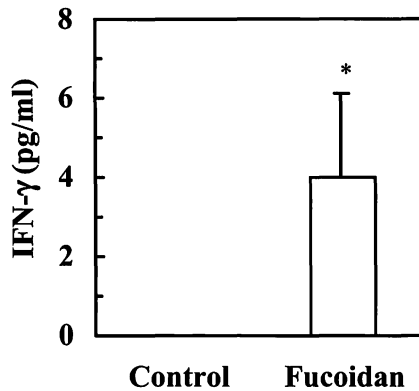


図11 抗原反復刺激ヌードマウス血清中IFN-γ産生量の検討

BALB/cヌードマウスにTNCBにて抗原反復刺激を行い血清中IFN-γ産生量をELISA法にて測定した。* $p < 0.05$ (検定)

crude fucoidan fractions prepared from edible brown seaweeds against L-1210 leukemia. *Hydrobiol.*, 116/117: 145-148.

- (4) Maruyama, H. & Yamamoto, I. 1984. Antitumor fucoidan fraction from an edible brown seaweed, *Laminaria religiosa*. *Hydrobiol.*, 116/117: 534-536.
- (5) Takahashi, M. 1983. Studies on the mechanism of hostmediated antitumor action of crude fucoidan from a brown marine alga *Eisenia bicyclis*. *J. Jpn. Soc. Reticulenthel Sys.* 22: 269-283.
- (6) Yamamoto, I., Maruyama, H., Takahashi, M. & Komiyama, K. 1986. The effect of dietary seaweed preparations on the growth of Sarcoma-180 cells subcutaneously implanted into

mice. *Cancer Lett.* 30: 125-131, 1986.

- (7) Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M. & Nakano, T. 2003. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *In vivo* 17: 245-250.
- (8) 于福功・北野秀夫・酒井武. 1997. 培養ヒト癌細胞アポトーシスを誘発するU-フコイダンの構造と活性の関連について. *日本癌学会 56 回総会記事* 56: 203.
- (9) Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46:11-147.
- (10) Djeu, J. Y., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T., Merberman, R. B. 1979. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.* 122(1): 175-181.
- (11) Suzuki, R., Handa, K., Itoh, K. & Kumagai, K. 1983. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL-2). I. Proliferative response and establishment of cloned cells. *J. Immunol.* 130(2): 981-987.
- (12) Itoh, K., Shibata, K., Shimizu, Y., Suzuki, R. & Kumagai, K. 1985. Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL2) in collaboration with interferon-gamma (IFN-gamma). *J. Immunol.* 134(5): 3124-3129.
- (13) Nastala, C. L., Edington, H. D., Mckinny, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A., Brunda, M. J., Gately, M. K., Wolf S. F., Schreiber, R. D. & Storkus, W. J. 1994. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma reproduction. *J. Immunol.* 153(4): 1697-1706.
- (14) Loza M. J. & Perussia, B. 2004. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56 + high stage and effector functions. *J. Immunol.* 172(1): 88-96.
- (15) Grunewald, S. M., Werthmann, A., Schnarr, B., Klein C. E., Brocker, E. B., Mohrs, M., Brombacher, F., Sebald, W. & Duschl, A. 1998. An antagonistic IL-4 mutant prevents type 1 allergy in the mouse: Inhibition of the IL-4 / IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms *in vivo*. *J Immunol.* 160: 4004-4009.
- (16) Tomkinson, A., Duez, C., Cieslewicz, G., Pratt, J. C., Joetham, A., Shanafelt, M.C., Gundel, R. & Gelfand, E. W. 2001. A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 166: 5792-5800.
- (17) Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M. & Nakano, T. 2005. Suppression of Th2 immune responses by Mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* Sporophylls. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137(4): 289-294.
- (18) 丸山弘子・飯塚真里子・橋本実・福寿宏樹・玉内秀一. 2005. メカブ由来フコイダンの抗原反復刺激誘発アトピー性皮膚炎モデルにおける抑制効果. *日本アレルギー学会 55 回総会記事* 54: 1021.

(北里大学大学院医療系研究科生体構造医科学群細胞組織病理学, 〒228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1)