

## 日本産海藻に含まれる多糖類の溶血阻害作用

著者	前田 陽一, 柴田 潔, 長谷川 和清, 荒井 千明
雑誌名	日本歯科大学紀要. 一般教育系
巻	43
ページ	35-39
発行年	2014-03-20
URL	<a href="http://doi.org/10.14983/00000682">http://doi.org/10.14983/00000682</a>

# 日本産海藻に含まれる多糖類の溶血阻害作用

## Inhibition of hemolysis activities by polysaccharides in the seaweed of japan

東京海洋大学  
日本歯科大学生命歯学部  
日本歯科大学附属病院

前田 陽一  
柴田 潔  
長谷川 和清  
荒井 千明

Youichi MAEDA<sup>1</sup>, Kiyoshi SHIBATA<sup>2</sup>, Kazukiyo HASEGAWA<sup>2</sup> and Chiaki ARAI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Course of Environmental Studies, Tokyo University of Marine Science and Technology,  
Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

<sup>2</sup>The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo  
Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, JAPAN

<sup>3</sup>The Nippon Dental University Hospital  
Fujimi 2-3-16, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8158, JAPAN

Hemolytic activities of crude extracts from 10 seaweed ( 2 green algae, 2 brown algae and 6 red algae ) were evaluated by the absorbance at 541nm on the spectrophotometric analysis. The activities of *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida* showed without density-dependent. Quantitative Analysis of Polysaccharides in algae by phenol-sulfuric acid reaction were carried out and revealed the inhibition of hemolysis activity were increased by the quantity of Polysaccharides although not proportional.

*Keywords:* algae, crude extract, Inhibition of hemolysis activity,

(2013年11月25日 受理)

近年、長寿社会を迎えた日本人にとって誰もが関心を示すテーマとして QOL を充実させるための健康維持法や病気の予防法などに関するものが、マスメディアなどで取り上げられることが多くなっている。それらの中で、海藻類に関連する様々な効能が示され、その有用性が一般に広く認知されるようになった。しかし、前報で記載したように、日本人と海藻との歴史は古く縄文時代までもさかのぼる。<sup>1)</sup>

海藻類の主要な成分は、主に炭水化物、脂質、タンパク質、ミネラル他、無機塩類、そして微量の海藻種に固有の有機化合物、ヨウ素などである。海藻種に固有の生理活性を示す有機化合物は、天然物化学の観点からみた面白さであり、活性成分の化学構造の特異性やそれらが示す作用などが注目され、多くの報告がなされている。<sup>2-3)</sup> 著者らも、これまで病原微生物に

対しての抗菌活性、IL6 の生成抑制作用や赤血球に対しての溶血作用など様々な活性を報告した。<sup>4)</sup>

過去の研究の中で実際に医薬品として利用されているものとしては、カイニンソウ属フジマツモ科の海藻であるカイニンソウ（海人草、別名マクリ）が挙げられ、その主成分もカイニン酸と命名され回虫駆除に使用されたことが報告されている。しかしながら、広く実用段階に進んだものは、殆ど無く *in vitro* での培養細胞や細菌類に対する作用やマウスなどの動物を用いた実験の結果に留まっている。

一方、炭水化物の多くは、骨格を形成する骨格多糖類であるセルロースと大型藻類など多くにみられる粘着性のある粘着多糖類が占めている。これらの構成糖は、緑藻、紅藻、褐藻など、種属により異なっており、分解した構成糖が同一であるかが確定しているだけで

表 1. 海藻が含有する多糖類

海藻	細胞壁骨格多糖	細胞間粘質多糖	貯蔵多糖
緑藻	セルロース I	キシロアラビノガラクトン硫酸	アミロース
	セルロース II	グルクロノキシロナムラナン硫酸	アミロペクチン
	$\beta$ -1,3-キシラン	グルクロノキシロラムノガラクトン硫酸	
	$\beta$ -1,4-マンナン		
褐藻	セルロース II	アルギン酸	ラミナラン
	ヘミセルロース	フコイダン	
紅藻	セルロース II	アガロース	紅藻デンプン
	ヘミセルロース	カラギナン	
	$\beta$ -1,3-マンナン	ポルフィラン	
	$\beta$ -1,4-キシラン		

\* 山田信夫：海藻利用の科学：成山堂書店、2000

分子量にはそれぞれ違いがあり、大まかに区別しているに過ぎない。しかし、いずれの多糖類も、人体では消化、吸収できず栄養源として利用できないものの食物繊維として注目され、Sea Vegetable と呼ばれ野菜の食物繊維の効能と同様に様々な生理作用が報告されていた。<sup>5-6)</sup>

ところが、近年の海藻類での報告では多糖類に対するものがみられ、成分含有量が高く効率よく採取できる大型海藻の粘着多糖類についての報告が増加している。例えば、メカブに含まれる機能性成分であるフコイダンは、帯状疱疹ウイルスやヒトサイトメガロウイルスに対する抗菌作用<sup>7)</sup>、NK細胞の活性化と免疫物質である INF- $\alpha$  の産生の増大<sup>8)</sup>、脂肪形成ならびに炎症関連遺伝子の活性化の阻害、単球細胞に働きかけることで、真菌や細菌に対する抗菌作用、C型肝炎ウイルス (HCV) 感染細胞での HCV の増殖抑制効果など様々な報告がなされている。

筆者らは、赤血球の溶血活性を有する藻種に固有の有機化合物を対象にスクリーニングを行ってきたが、その過程においても溶血活性が濃度依存的でなく変化する試料がみられた。すなわち、ある特定の試料濃度で、海藻に含まれる粘着多糖類的作用により溶血活性が減少していると思われる結果となっていた。これらのことから本報告では、再度その変化を確認するとともに、保護作用の解明を目的として糖の定量を行い、興味ある新たな知見が得られたので以下に報告する。

## 材料と方法

### 試料の調製

#### 1) 海藻の採取

本研究に用いた藻類は、神奈川県横須賀市および横浜市、静岡県下田市、茨城県ひたちなか市、新潟県柏崎市、千葉県館山市の各地より採集した。海藻類は岩礁あるいは砂浜の海岸より採取し、いずれの藻類も採取の後、速やかに  $-25^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、評価試料とした。使用した藻類は、前回同様、緑藻類 2 種 (ヒラアオノリ、ヘライワズタ)、褐藻類 5 種 (ヒラクサ、マクサ、スギノリ、コメノリ、オオバツノマタ)、紅藻類 3 種 (アラメ、ワカメ、ツルモ) である。

#### 2) 溶血活性の測定

##### ① 粗抽出物溶液と評価試料の調製

凍結保存していた各種藻類試料を室温において自然解凍し、付着物を除去した後、表面の水分をキムワイプで除き、0.3 g (湿重量) を秤量した。次いで、秤量した藻片を油圧プレス (500kg/cm<sup>2</sup>, 全圧力 5 t) にて粉碎し、ペースト状にした。これを乳鉢に移し、生理食塩水を 2 ml 加えて、もとの藻片の形状が完全に無くなるまで粉碎した。次いで、生理食塩水 2.5 ml を加えて攪拌し、最終濃度を葉片 0.1 g に対し生理食塩水 1.5 ml (0.3g / 4.5 ml) に調整した。この藻片懸濁液を綿栓濾過し、粗抽出

物溶液(非希釈試料、以下‘1/1’と表記)とした。評価対象海藻1種について、4倍希釈法により順次希釈し、4段階の試料濃度を調製し、評価試料とした。すなわち、試験管3本にそれぞれ生理食塩水600 $\mu$ lを分注後、第一の試験管に非希釈試料(1/1)200 $\mu$ lを加え攪拌機で攪拌し、濃度を1/4とした溶液を得た。次いで、第二の試験管に第一試験管の溶液(1/1)200 $\mu$ lを分取し加え、攪拌機で攪拌した。さらに、同様の操作を繰り返すことにより、試料濃度1/4、1/16、1/64の各濃度の評価試料を調製した。

## ② 血球懸濁液の調製

ヒツジ無菌脱繊維素全血(血球数およそ $320 \times 10^4/\mu$ l、Sheep Whole Blood Defibrinated Sterile)3mlに生理食塩水3mlを加え攪拌し、遠心機(國産遠心器H18-A)を用いて遠心分離(3000rpm、3min)後、駒込ピペットで上澄みを除去した。この操作を3回繰り返した後、残渣部分に生理食塩水を加え総量を2mlとした。これにより血球数は、およそ $500 \times 10^4/\mu$ lとなり、これまでと同様の赤血球となり溶血作用を比較することができる。

## ③ 吸光度による溶血活性の測定

藻類1種につき、遠心管6本に生理食塩水3640 $\mu$ lを分注し、それぞれに赤血球母液160 $\mu$ lを加えた。これに、3段階の濃度の評価試料(1/1、

1/4、1/16)を、各濃度2本としてそれぞれ200 $\mu$ l分注した。これらを攪拌機にて攪拌し、室温(約23 $^{\circ}$ C)下で60分間静置した。これを溶血試料として、遠心分離(3000rpm、30sec)により血球やその残滓を沈殿させ、上澄み3mlを石英セルに移し、三木らの方法<sup>9)</sup>に従い541nmおよび576nmにおける吸光度を分光光度計で測定した。

評価試料を添加した溶血試料のコントロールとして、同一濃度の評価試料200 $\mu$ lと生理食塩水3800 $\mu$ lを混合のうえ攪拌した後、遠心分離(3000rpm、30sec)して得た上澄みを用い、他試料との比較時の着色の影響を排除した。

また、溶血活性の陽性試料として、一次希釈液調整時に、生理食塩水の代わりに純水を用いたものを溶血判定の100%として数値化した。

使用機器：分光光度計U-2810 日立製作所製

## 3) フェノール・硫酸法による全糖量の定量<sup>10-11)</sup>

### ① 粗抽液の調整および評価試料の調製

凍結保存していた各種藻類試料を室温において自然解凍し、付着物を除去した後、表面の水分をキムワイプで除き、20g(湿重量)を秤量した。全量をビーカーに移し、冷却器により-25 $^{\circ}$ Cに冷却後凍結乾燥機により72時間減圧乾燥により、水分を除去した海藻体を得た。試料により異なるが、約6~1gの乾燥試料が得られた。次いで、ミルキサーにより粉砕し粗末粉末とした。次いで、

表2. 試料藻類種とその採取地・採取日

No.	和名	学名	採取地	採取日
10	アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>	神奈川県横須賀市天神島	1999年12月15日
118	ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	茨城県ひたちなか市平磯	2000年4月23日
85	ツルモ	<i>Chorda filum</i>	新潟県柏崎市鯨波	2000年8月8日
49	ヒラクサ	<i>Ptilophora irregularis</i>	静岡下田市田牛	2000年4月5日
139	マクサ	<i>Gelidium elegans</i>	神奈川県横須賀市天神島	1999年12月15日
13	スギノリ	<i>Chondracanthus tenellus</i>	神奈川県横須賀市天神島	1999年12月15日
58	コメノリ	<i>Carpopeltis prolifera</i>	千葉県館山市坂田	2000年6月4日
138	オオバツノマタ	<i>Chondrus giganteus</i>	神奈川県横須賀市天神島	1999年12月15日
92	ヒラアオノリ	<i>Enteromorpha compressa</i>	神奈川県横浜市野島	2000年2月23日
97	ヘライワズタ	<i>Caulerpa brachypus</i>	千葉県館山市坂田	2001年5月25日

\*各海藻種に付した数字(No.)は、本学化学教室に保存中のサンプル整理番号に対応する。

粗粉末 50mg に蒸留水を 200ml 加え 48 時間攪拌放置した後、遠心分離を行い、上清と沈殿とに分離し、上澄部分を対象試料とした。

## ② フェノール・硫酸法による定量

試料に含まれる糖質の量を標準物質にグルコースを用い、フェノール・硫酸法によりグルコース相当量として算出した。すなわち、対象試料 1.0ml を試験管にとり、5% フェノール 1.0ml と特級濃硫酸 5.0ml を加え攪拌し、室温で 20 分程放置した後、490nm で吸光度を測定した。グルコースを用いた標準直線は、100 $\mu$ l から倍々希釈法にて得られた濃度と吸光度よりも求めた。最終的な溶出糖量は、採取試料の状態として水分を含む状態での比率として表すことにした。

使用機器：分光光度計 U-2810 日立製作所製

## 結果と考察

本報告の各海藻の溶血活性値は、同一の海藻試料にかかわらず前報よりも高い値を示した。赤血球数を同一とし、生物検定を行ったにもかかわらず、赤血球の保存状態の差により生じたものと思われる。このことから、比較検討を行う上で適切な標準試料が必要であることは急務である。

今回の測定結果から、アラメ (10) は、53.6%(1/1)、16.3%(1/4)、11.6%(1/16)、0.2%(1/64) の各濃度に対する溶血活性値を示した。同様に、ワカメ (118) は、49.1%(1/1)、13.6%(1/4)、20.9%(1/16)、0.3%(1/64) の各値を示した。いずれも測定試料原液 (1/1) および (1/4) の溶血活性が、他の海藻よりも低い値となっている。さらに、希釈した (1/16) の濃度の試料でみられる溶血活性が高いことから、測定試料の濃度が高いときに細胞保護作用が現れていることが推定された。

一方、スギノリ (13)、コメノリ (58)、オオバツノマタ (138)、ヒラアオノリ (92)、ヘライワヅタ (97) では、評価試料濃度と溶血活性の相関は濃度に依存した関係であることを示していた。また、前報で保護作用

がみられたツルモ (85) では、85.3%(1/1)、35.3%(1/4)、28.3%(1/16)、3.2%(1/64) を示し、今回の測定では明確な差として現れていない。

ところで、これらの溶血活性は、各種海藻から有機溶媒抽出により得られた粗抽出物でも見られるものであることから、海藻に含まれる固有の有機微量物質と思われる。一方、赤血球保護作用は、試料濃度が高いときにみられ、希釈段階が進むにつれて見られなくなることから、アラメ (10) やワカメ (118) それぞれに含まれる多糖類が作用するものと推定される。そのため、それぞれの海藻試料を乾燥後粉碎して含まれる可溶性の糖類の存在量を求めた。次いで、フェノール・硫酸法によりグルコース相当量を算出後、水分を含む海藻試料中の存在量比を重量パーセント (%) で表し、表 3. に示した。

その結果、褐藻類のアラメ (10) やワカメ (118) には大量の可溶性の糖質が含まれており、これらが赤血球の溶血を抑える働きをしていることが推定された。一方で、紅藻や緑藻では、含水量が高いため、可溶性の糖質量は褐藻より少ない、しかしながら、ヒラクサ (49) 原液 (1/1) では、ワカメ (118) の希釈液 (1/4) よりも高い可溶性糖質を含んでいるものの保護作用を示していない。これらのことから、多糖類の構成糖などにより作用に違いがあるものと思われる。すなわち、表 1. に示したように、褐藻に含まれる細胞間粘質多糖は、アルギン酸あるいはフコイダンであることが知られている。一方、緑藻のキシロアラビノガラクトサン硫酸やグルクロノキシロナムラナン硫酸と紅藻にみられるラギナンやポルフィランと構造上の大きな違いは無いものの存在量や硫酸基の数による粘液物質の粘性や硬さの違いなどがあり、今後の詳細な検証が必要である。

また、アルギン酸あるいはフコイダンとも加水分解により構成糖は明確ではあるものの、それらのおよその分子量なども種により異なるものと思われ、ゲル濾過法などのクロマトグラフィーを用いる手法により、大まかに分子量を把握後、赤血球の保護作用の出現に必須な要素などを明らかにしていく予定である。



表 3. 藻類の溶血活性値<sup>\*</sup> と可溶性の糖質量<sup>\*\*</sup>

藻類種名	評価試料	測定波長 (541nm)				水溶性糖量 (%)
		1/1	1/4	1/16	1/64	
褐藻類	10 アラメ	53.6	16.3	11.6	0.2	4.53
	118 ワカメ	49.1	13.6	20.9	0.3	2.94
紅藻類	85 ツルモ	85.3	35.3	28.3	3.2	0.66
	49 ヒラクサ	87.1	49.1	22.6	3.1	1.25
	139 マクサ	75.1	40.5	12.6	1.0	0.91
	13 スギノリ	92.6	56.2	12.1	2.5	0.59
	58 コメノリ	73.6	32.6	9.2	1.2	0.51
緑藻類	138 オオバツノマタ	49.1	29.8	6.0	0.5	1.03
	92 ヒラアオノリ	43.2	29.3	7.5	0.1	0.11
	97 ヘライワズタ	59.5	21.7	1.3	0.0	0.47

<sup>\*</sup> 蒸留水による溶血量を 100% として、試料の溶血量を % で表した。

<sup>\*\*</sup> グルコースに換算した糖質量を示す。

## 謝 辞

海藻の採取および種同定について助言下さいました東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科藻類学研究室の田中次郎教授に御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、傘孝之教授ならびに南雲保教授には、多大なるご配慮を賜りましたことをここに御礼申し上げます。

## 文 献

- 柴田潔, 長谷川和清, 荒井千明: 日本産海藻の赤血球に対する溶血作用と保護作用: 日本歯科大学紀要, 一般教育系, **38**: 51 - 56, 2009
- 越智雅光: 水産学シリーズ 45, 海藻の生化学と利用. 抗菌性成分. : 日本水産学会編 恒星社厚生閣, 東京 pp. 101-119.
- 山田信夫: 海藻利用の科学: 成山堂書店. 2000
- 柴田潔, 薩摩林貞美, 田中次郎: 海藻由来の生理活性物質の探索 I. 分離精製方法および抗菌活性: 日本歯科大学紀要, 一般教育系, **29**: 117-124. 2000.
- M. Murata, K. Ishihara & H. Saito, Hepatic fatty acid oxidation enzyme activities are stimulated in rats fed the brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (Wakame), *J.Nutr.*129, 146-151, 1999
- M. Murata, Y.Sano, K. Ishihara & M. Uchida, Dietary fish oil and *Undaria Pinnatifida* (Wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol, *J. Nutr.*, **132**, 742-747, 2002
- Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T, Hayashi T.: Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). : *Chem Pharm Bull (Tokyo)* : **52**(9):1091-4, 2004
- Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T. : Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. : *In Vivo*. **17**(3):245-9. 2003.
- Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., and Niki, E. Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by  $\alpha$ -Tocopherol, *Arch. Biochem. Biophys.* **258**: 373-380. 1987.
- Whistler, R. L. et al.: *Methods in carbohydrate chemistry I*, p.388, Academic press 1962.
- 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東京大学出版会 1969.