

日本産海藻に含まれる多糖類の赤血球保護作用 Inhibition of Hemolysis Activities by Polysaccharides from Seaweed of Japan.

日本歯科大学生命歯学部 柴田 潔
長谷川 和 清

日本歯科大学附属病院 荒井 千 明

Kiyoshi SHIBATA¹, Kazukiyo HASEGAWA¹ and Chiaki ARAI²

¹Department of Chemistry, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

²The Nippon Dental University Hospital, 2-3-16 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8158, Japan

Abstract: Hemolytic activities of crude extracts from 5 seaweed (1 green algae, 1 brown algae and 3 red algae) were evaluated by the absorbance at 541nm and 576nm on the spectrophotometric analysis. A crude product extract with organic solvents from seaweed showed high hemolysis activity than the homogenized solution from seaweed by ultrasonic homogenizer. Some homogenized solutions that contain polysaccharides showed inhibition of hemolysis activities.

Key words: Seaweed, extract, Inhibition, hemolysis activity,

(2016年3月11日 受理)

1 はじめに

海藻類の主要な成分は多糖類であり、次いで脂質やタンパク質、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。糖質は海藻の一般組成の中で最も含量が高く、乾燥重量あたり約40~70%にも相当し、その主体は多糖類である¹⁾。多糖類の構成糖は、細胞壁骨格多糖、細胞間粘質多糖及び貯蔵多糖により異なる。

細胞壁骨格多糖の多くはセルロース、マンナンなどに代表される一般的な中性糖を構成糖としたものであり、同様に貯蔵多糖もアミロースやアミロペクチンなどのグルコースより構成される中性糖が中心である。一方で、細胞間粘質多糖はこれらと異なり、種により違いが見られる。

緑藻では、水酸基の一部を硫酸残基で置換したキシロアラビノガラクトサンやグルクロノキシロラムナン、グルクロノキシロラムノガラクトサンなどである。一方、アサクサノリなどの紅藻類、ア

マノリ属海藻ではポルフィランでありガラクトースに由来し多数の硫酸残基が結合した構造である。紅藻類テングサ属海藻、オゴノリ属海藻では寒天が細胞間粘質多糖であり、ポルフィランにピルビン酸、グルクロン酸を含んだ構造となっている。ツノマタなど紅藻類ツノマタ属、ズキノリ属、キリンサイ属海藻ではカラギーナンであり、ワカメ、コンブ、ヒジキなどの褐藻では分子内にカルボキシル基を有するアルギン酸などが構成糖としてみられる²⁾。

水中で藻体より溶出する粘質多糖類の役割や生理作用については明らかではないものの、モデル実験系や *in vitro* の実験系では、高分子多糖による粘膜、細胞膜などの保護作用によると思われる効果や多数のカルボキシル基や硫酸残基によるイオン交換樹脂のような陽イオンの吸着によるなど様々な効能が報告されている^{3,4)}。

著者らも前報で報告したように、一部の海藻類において海藻より抽出した試料の赤血球に対する

溶血効果が濃度に依存せず、高濃度で溶血効果の阻害が生じていることを報告した⁵⁾。これは、高分子の細胞間粘質多糖により赤血球の細胞膜が保護された結果と考えられた。そして、HPLC クロマトグラムにおけるゲル濾過法によりアラメ (10) に含まれる高分子の多糖は 120Kd 前後の分子量を示すことを明らかにした⁵⁾。

一方、生理活性を有する有機化合物の多くは、海藻内に僅かしか含まれないものの遊離アミノ酸、ペプチド、アミンおよびヌクレオチド類を基本骨格にもち、それにアミノ基や第三級級窒素、第四級アンモニウム塩基などの窒素を含む残基を有するものが多く見られる⁶⁾。これらのことを踏まえ、数種の海藻について、活性物質を示す化合物を脂溶性物質と想定し有機溶媒抽出より得た海藻抽出物質と海藻を粉碎して得た多糖類を含む溶液での赤血球に対する溶血作用を比較した。この結果、含まれる多糖の効果が明確に認められたのでこれらについて報告する。

2 材料と方法

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、千葉県館山市の各地より採集した保存試料を使用した。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°C で凍結保存し、試料として使用前に必要量を解凍し評価試料とした。使用した藻類は、次の 5 種 (アラメ(10)、ツルモ(85)、スギノリ(13)、オオバツノマタ(138)、ヘライワズタ(97)) である。

2) 溶血活性の測定 (吸光度による溶血活性の測定)

① 海藻破碎による試料の調製

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 ($500\text{kg}/\text{cm}^2$, 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。

② 有機溶媒での抽出物質を用いた試料調整

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、表面の水分をキムワイプで除板海藻いた各海藻(10g)を秤取り、各辺およそ 5mm 以下に裁断後、メタノール(20ml)を加え 24 時間放置した。次いで、クロロホルム(80ml)を加え更に 24 時間経過後、上澄みを濾過して抽出液とした。同様の操作を再度繰り返し、得られた抽出液を先の抽出液と合わせた。これらの抽出液を分液漏斗に移した後、蒸留水 200ml を加え、分配させた後、有機層のみを分取して、塩化カルシウムを 20g 加えた 6 時間放置した後濾過し、減圧乾固した。得られた油状物質は真空ポンプで乾燥後海藻粗抽出物質として重量を測定し溶血活性測定試料とした。ついで、海藻(10g)より得られた粗抽出物質をこれまでの溶血活性測定の結果と比較するため、同一の最終濃度を海藻片 0.1 g に対し生理食塩水 1.5 ml (0.3g / 4.5 ml) に調整した。すなわち、得られた粗抽出物質の 100 分の 1 の量が海藻片 0.1 g 中に存在する抽出物質に相当することから、0.2ml の DMF に溶解後、生理食塩水 1.3 ml を加え全量を 1.5 ml とした。そして、この藻片懸濁液同様に粗抽出物溶液 ('1/1') とした。

③ 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 $400 \times 10^4/\mu\text{l}$, Sheep Whole Blood Defibrinated Sterile) 3ml に生理食塩水 3ml を加え攪拌し、遠心機(園産遠心器 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

表 1 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
85	ツルモ	<i>Chorda filum</i>	新潟県柏崎市鯨波	2000年8月8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
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
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

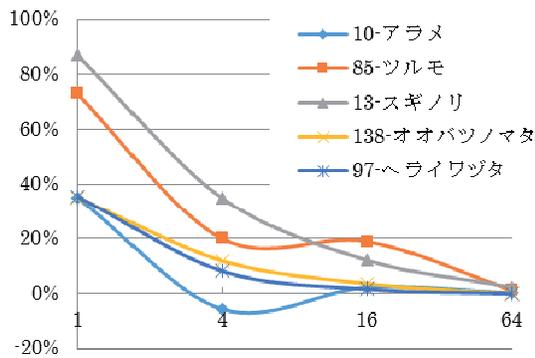


図1 海藻の破砕抽出液の溶血活性

回繰り返した後、残渣部分に生理食塩水を加え総量を 2.4 ml とした。これにより血球数は、およそ 500 x 104/μl となり、これまでと同様の赤血球量と同一とした。

④ 粗抽出物溶液と評価試料の調製

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 600μl を分注後、第一の試験管に非希釈試料 (1/1) 200μl 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) 200μl 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。

⑤ 吸光度による溶血活性の測定

藻類一種につき、遠心管 6 本に生理食塩水 3640μl を分注し、それぞれに赤血球母液 160μl 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 200μl 分注した。これらを攪拌機にて攪拌し、室温(約 23°C)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渣を沈殿させ、上澄み 3ml を石英セルに移し、三木らの方法⁷⁾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判定試料のベースラインは、各濃度の評価試料 200μl と生理食塩水 3800μl を遠心分離(3000rpm, 30sec)により得た上澄みを用い、着色などによる影響を除いた。

自然溶血の影響は、一次希釈液と生理食塩水を混合した試料の測定値と前述のベースラインの値との差より求め、各測定値を補正した。また、一次希釈液と純水を混合したものを測定 1 時間での完全溶血として 100%として、各試料の値を百分率で算出し、各評価試料の溶血活性値とした。

3 結果と考察

吸光度測定の結果、評価を行った 5 種の藻類は、前報において破砕液溶出した試料が溶血活性を示したものであるが、ほぼ同様の結果を示していた。表 2 に各濃度における溶血活性を百分率で表した。また、図 1 では、その値に従いプロットした後、近似曲線を用いて推定できる溶血活性阻害の傾向を示した。その結果、大まかに二つのグループに分けることができた。すなわち、溶血活性が濃度依存的に変化するスギノリ (13)、オオバツノマタ (138) とヘライワヅタ (97) の一群とツルモ(85) とアラメ (10) にみられるように、次の 1/4 の濃度の試料より低いか同程度の溶血活性しか示さず、試料濃度だけでは説明できない現象がみられる一群である。これまで、この現象は粘質多糖類の一定濃度以上存在するとき、赤血球の表面を保護しているものと推定していた。今回、細胞間粘質多糖を含む藻類からの破砕抽出液と細胞間粘質多糖が有機溶媒に不溶であることから、多糖類を含まない有機溶媒抽出液の溶血活性を比較した。その結果、アラメ (10) の測定原液 (1/1) では有機溶媒抽出による測定液では 67.5%であるのに対して、粉砕抽出液より調整した測定液では、35.2%を示した。同様に 4 倍希釈 (1/4) を行った調整液では、有機溶媒抽出による測定液では 18.6%であるのに対して、粉砕抽出液より調整した測定液では、

表 2 藻類からの破砕抽出液及び有機溶媒抽出物の懸濁液の溶血活性

No.	和名	破砕抽出の溶血活性 (%)				有機溶媒抽出の溶血活性 (%)			
		1/1	1/4	1/16	1/64	1/1	1/4	1/16	1/64
10	アラメ	35.2	-5.6	2.3	0.3	67.5	18.6	3.2	0.2
85	ツルモ	73.0	20.0	19.0	1.2	95.0	32.1	16.4	2.6
13	スギノリ	87.1	35.0	12.2	2.3	96.2	31.4	9.4	2.4
138	オオバツノマタ	35.2	12.0	3.6	0.0	45.0	15.3	4.2	0.6
97	ヘライワヅタ	35.6	8.2	1.6	0.0	54.7	13.3	2.4	0.4

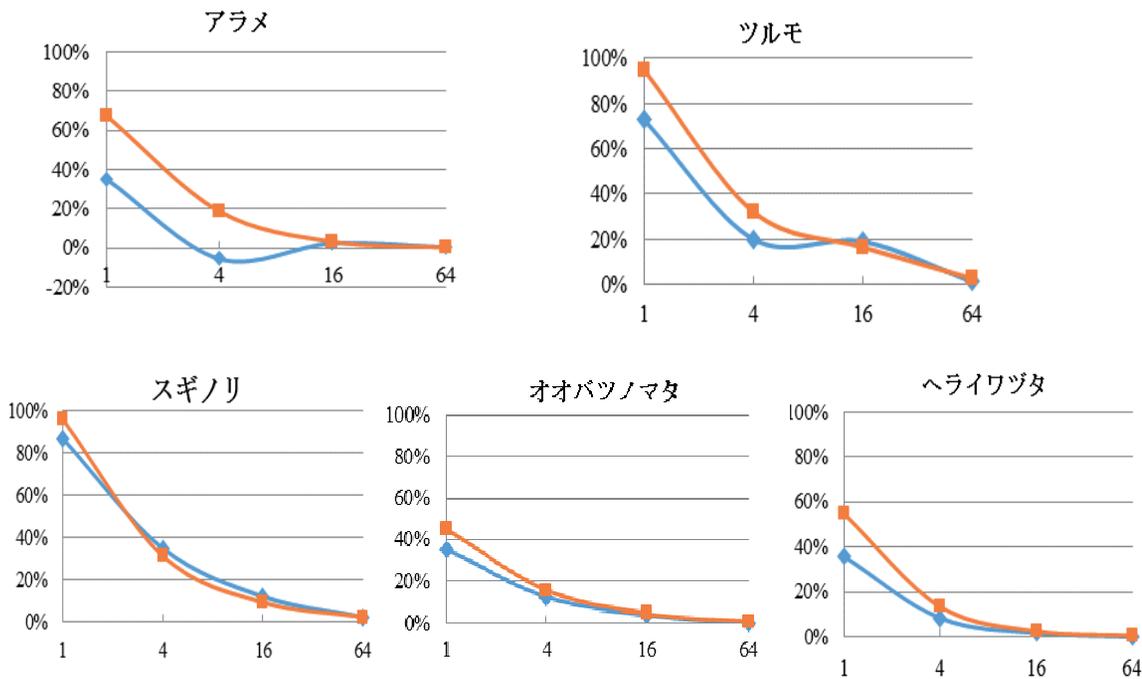


図2 藻類からの破碎抽出液及び有機溶媒抽出物の懸濁液の溶血活性の比較

-5.6%を示した。両濃度において著しい溶血活性の差がみられた。一方、16倍希釈(1/16)の調整液においては、有機溶媒抽出による測定液では3.2%であるのに対し、粉碎抽出液より調整した測定液では、2.3%を示し両濃度において著しい溶血活性の違いがみられなかった。同様に、64倍希釈(1/64)の調整液においても、有機溶媒抽出による測定液では0.2%であるのに対し、粉碎抽出液より調整した測定液では0.3%を示し、こちらでも差異は認められない。このことから、これまで、4倍希釈(1/4)でのみ溶血活性阻害の現象がみられているものと思われていたが、測定原液(1/1)でも同様の溶血活性阻害作用がみられており、一定の濃度以上の特定の細胞間粘質多糖が含まれているときに、溶血活性を阻害することが確認された。

このことはツルモ(85)でも見られ、原液(1/1)では有機溶媒抽出による測定液では95.0%、粉碎抽出液より調整した測定液では、73.0%を示した。4倍希釈(1/4)では、31.2%、20%、16倍希釈(1/16)では、16.4%、19.0%、64倍希釈(1/64)では、2.6%、1.2%とアラメ(10)と同様に高濃度の時に、溶血活性の低下がみられ、溶血活性を阻害していることが確認された。今後、さらに他の藻類でも確認されるか検討するとともに、細胞間粘質多糖の特定や存在量と溶血活性阻害効果との相関も検討する予定である。

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。

文献

- 1) 海藻の本. 著者 西沢一俊, 村杉幸子. 研成社. 1988
- 2) 山田信夫: 海藻利用の科学: 成山堂書店. 2000.
- 3) 青木央. コンプの健康機能成分—アルギン酸とフコイダン. 日本味と匂学会誌 2007, **14**, p.145-152.
- 4) 西野貴司, 名雲照一. 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成と抗血液凝固作用. 日本農芸化学会誌 1987, **61**, 3, p361-363.
- 5) 前田陽一, 柴田潔, 長谷川和清, 荒井千明: 日本産海藻に含まれる多糖類の溶血阻害作用, 日本歯科大学紀要, 2014, **43**, p35-39.
- 6) 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 2015, **44**, p37-41.
- 7) 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 α -Tocopherol, Arch. Biochem. Biophys. 1987. **258**, p 373-380.