

日本産海藻の赤血球に対する溶血作用と保護作用

Hemolytic and Protective Activities of The Japanese Seaweed for Red Blood Cell. II.

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

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

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

Hemolytic and protective activities of crude extracts from 9 seaweed (2 green algae, 2 brown algae and 6 red algae) to sheep red blood cell were evaluated by the absorbance at 541nm and 576 nm on the spectrophotometric analysis.

All the seaweed which investigated showed hemolysis activities. Most of all seaweed showed activities that were density-dependent. In the case of *Eisenia bicyclis*, *Undaria pinnatifida* and *Chorda filum*, we detected the hemolysis activities were decrease once, and revived at the low concentration by adhesive polysaccharides.

Key index words: algae, crude extract, hemolytic activity, spectrophotometric analysis

(2012 年 11 月 30 日 受理)

有史以前から、日本人が海藻を食料としてことは、海浜部に位置する青森県亀ヶ丘の遺跡などから、土器と共にワカメなどの海藻が発見されていることから明らかである。日本は四方を海に囲まれた島国であり、周辺海域は暖流と寒流が交錯する養分に富んだ地域であることから格好の藻場となり多数の海藻が生息しやすい環境にあることにほかならない。

万葉集には「和可米」「稚海藻」(ワカメ)が頻出し、平城宮木簡からは各地で採れたワカメを朝廷への献上品していたことが明らかになっている。また、奈良時代にはワカメを含む多くの海藻が神饌として正倉院に奉納されており、生活に欠かせない貴重なものとして扱われていることが推察される。

海藻類の水分を除いた主な成分は、表 1. にワカメを一例として示したように、炭水化物、脂肪、タンパク質が主な組成となっている。そして、海水に含まれ

ていた無機塩類やそれぞれの海藻に固有の塩類や有機化合物などが少量含まれている¹⁾。

特に、炭水化物の多くを占める多糖類のうち、細胞壁に含まれ骨格となる多糖類は、緑藻、紅藻、褐藻での違いは一部であり、多くはセルロースとヘミセルロースである。ヘミセルロースはキシランやマンナンのほか、グルコマンナンやグルクロノキシランなどのような複合多糖である。一方、細胞間に存在する粘質多糖類は、種により異なっており、緑藻のアオサ、アオノリでは、硫酸グルクロノキシロラムナンが、ミル、イワツタでは、含硫酸キシロアラビノガラクトンそして、カサノリなどでは含硫酸グルクロノキシロラムノガラクトンが含まれている。紅藻類では、テングサ、スギノリ、イギスには、アガロース、スギノリ、オキツノリにはカラギーナンが、アマノリにはポルフィランが主に含まれる。また、褐藻類の粘質多糖類はワカ

Table 1. 生わかめの成分組成

| | |
|------------------------|---------|
| 水分 | 79.99 g |
| 炭水化物 | 9.14 g |
| 糖分 | 0.65 g |
| 食物繊維 | 0.5 g |
| 脂肪 | 0.64 g |
| 飽和脂肪酸 | 0.13 g |
| タンパク質 | 3.03 g |
| ※生わかめ100gあたりの各成分重量 (g) | |

メ、コンブ、アラメ、カジメでは、アルギン酸、ヒバマタではフコイダンなどであることが知られている。これらには、個別の名称はあるものの、アガロースはゲル化しやすい中性多糖でガラクトースとアンヒドロガラクトースの 1→4 結合体 (D-Galβ1→3L-AGα1)n であり、カラギーナンは直鎖含硫黄多糖類の一種で、ガラクトースとアンヒドロガラクトースの 1→4 結合体の硫酸エステル (D-Galβ1→3L-AGα-6-Sulfate→)n である。構成糖はアガロースと同一であるが硫酸エステル部分を多く含む点で異なる。

また、ポルフィランも、アガロースと基本の糖部分の構成糖は同一で硫酸エステル部分が結合した構造 (D-Galβ1→3L-AGα1→3-D Galβ1→3L-Gal-6-Sulfate→)n である。アルギン酸は、マンヌロン酸 (M) とグルロン酸 (G) の 2 種のブロックが 1→4 結合した直線状のポリマーである。フコイダンは、主成分がフコースである多糖類の総称であり、糖鎖にはガラクトースやマンノース、キシロース、ウロン酸が含まれる。グルクロン酸を含む U- フコイダン、硫酸化フコースだけからなる F- フコイダン、ガラクトースを含む G- フコイダンなどに分類される。構成している単糖に違いがあるものの性質の違いはあまり無く、人体では、アガロース、アルギン酸、カラギーナン、フコイダンはこれらの多糖類を分解消化する酵素群をもたないため、栄養素としての利用はできず、食物繊維としての働きを期待することに限られる。しかし、最近の欧米でのヘルシー志向の高まりから、藻類に含まれる多糖類が食物繊維として注目され、食材として利用することも増えたことから Sea Vegetable と呼ばれることも多く、抗血液凝固作用²⁻³⁾、抗ウイルス作用⁴⁾、コレステロール・血圧低下作用⁵⁻⁶⁾、そして抗ガン作用⁷⁾と多くの機能

性が報告されている。

著者らは、海藻固有の有機物質に注目し、これまでに抗菌活性、抗 IL6 活性、赤血球に対する溶血作用について数種類の海藻抽出成分が活性を示すことを報告した⁸⁻¹¹⁾。特に、赤血球に対する溶血作用を示す成分は捕食により体内細胞に損傷を与えることから、液胞中に含まれる硫酸や苦味成分と同様に捕食に対する忌避作用があるものと結論付けたが、赤血球に対する溶血作用と同時に海藻成分により溶血作用が減弱される保護作用についても検討し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、神奈川県横浜市、横須賀市、茨城県ひたちなか市、静岡県下田市、新潟県柏崎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℃ で凍結保存し、評価試料とした。

今回、使用した藻類は、緑藻類 2 種 (ヒラアオノリ、ヘライワズタ)、紅藻類 5 種 (ヒラクサ、マクサ、スギノリ、コメノリ、オオバツノマタ)、褐藻類 2 種 (アラメ、ワカメ、ツルモ) である。

2) 粗抽出物溶液の調製

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、0.3g (湿重量) を秤量した。次いで、秤量した藻片を油圧プレス (500kg/cm²、全圧力 5t) 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 2.5ml を加えて攪拌し、最終濃度を葉片 0.1g に対し生理食塩水 1.5ml (0.3g / 4.5ml) 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。

Table. 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> | 静岡県下田市田牛 | 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。

3) 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 600 μ l を分注後、第一の試験管に非希釈試料 (1/1) 200 μ 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 μ 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。

溶血活性の測定

1) 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 x 10⁴/ μ 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 x 10⁴/ μ 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た。

2) 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 μ l を分注し、それぞれに赤血球母液 160 μ 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 μ l 分注した。これらを

攪拌機にて攪拌し、室温（約 23℃）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¹²⁾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吸光度測定の対照（ベースライン）には、4 濃度の評価試料のそれぞれについて、評価試料 200 μ l と生理食塩水 3800 μ l を遠心管で混合のうえ攪拌し、遠心分離（3000rpm、30sec）して得た上澄み 3ml を用いた。

溶血活性の対照試験として、一次希釈液と生理食塩水を混合したネガティブ試験（対照 N）、および一次希釈液と純水を混合したポジティブ試験（対照 P）を設定した。それぞれ遠心管 2 本に赤血球母液 160 μ l と生理食塩水あるいは純水 3800 μ l を分注・攪拌し、以後の操作は溶血試料と同様に行った。

両対照試験溶液の波長 200 ~ 780nm における吸光スペクトルを測定し、541nm および 576nm にピークが存在することを確認した。対照 N の平均吸光値を自然溶血による値として、各溶血試料の測定値から差し引いた。対照 P の平均吸光値を 1 時間静置における溶血作用の 100% の値として、溶血試料の自然溶血分を差し引いた吸光値との比をとった。これを各溶血試料の評価試料添加の影響による溶血分として百分率で算出し、各評価試料の溶血活性値（表 2）として、比較検討した。

使用機器：分光光度計 U-2810 日立製作所製

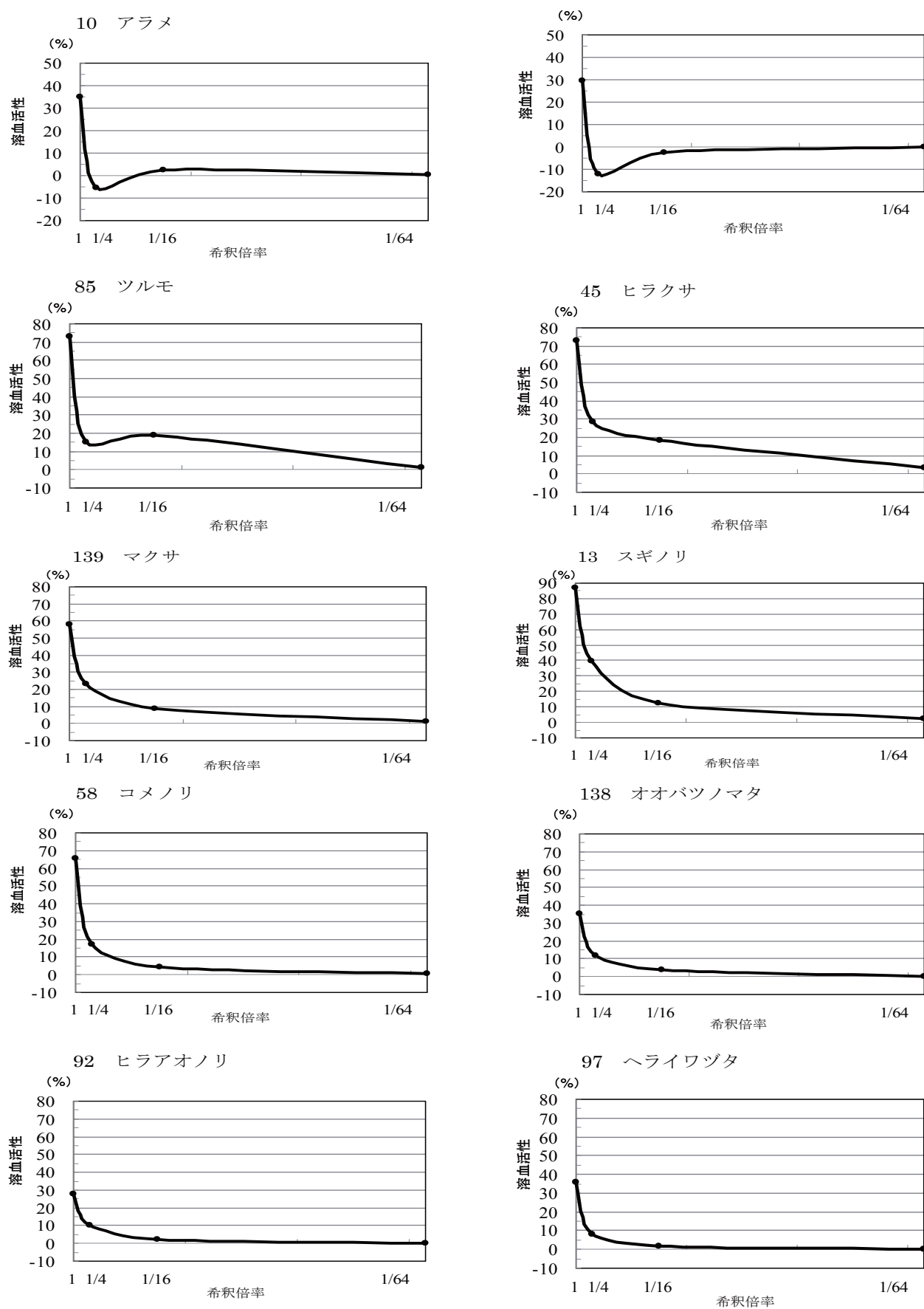


Fig. 1. 各藻類抽出試料の吸光度による溶血活性と希釈倍率

Table. 3. 各藻類種評価試料の2波長測定値に基づく溶血活性

| 測定波長 | | | 541nm | | | | 576nm | | | |
|------|------|---------|-------|-------|------|------|-------|-------|------|------|
| 藻類種名 | 評価試料 | | 1/1 | 1/4 | 1/16 | 1/64 | 1/1 | 1/4 | 1/16 | 1/64 |
| 褐藻類 | 10 | アラメ | 35.2 | -5.6 | 2.3 | 0.3 | 37.3 | -5.9 | 2.0 | 0.3 |
| | 118 | ワカメ | 29.7 | -12.0 | -2.3 | 0.2 | 31.0 | -10.3 | -1.6 | 0.2 |
| 紅藻類 | 85 | ツルモ | 73.0 | 15.1 | 19.0 | 1.2 | 70.5 | 16.2 | 17.1 | 0.8 |
| | 49 | ヒラクサ | 73.3 | 28.6 | 18.2 | 3.2 | 71.3 | 27.1 | 16.4 | 2.0 |
| | 139 | マクサ | 58.2 | 23.2 | 8.5 | 1.3 | 55.6 | 20.7 | 8.1 | 0.4 |
| | 13 | スギノリ | 87.1 | 39.8 | 12.2 | 2.3 | 83.6 | 35.4 | 10.7 | 1.4 |
| | 58 | コメノリ | 65.7 | 17.2 | 4.4 | 0.6 | 59.8 | 17.3 | 3.2 | 0.0 |
| 緑藻類 | 138 | オオバツノマタ | 35.2 | 12.0 | 3.6 | 0.0 | 31.1 | 10.3 | 1.8 | 0.1 |
| | 92 | ヒラアオノリ | 27.6 | 10.0 | 2.3 | 0.2 | 24.9 | 8.3 | 1.2 | 0.0 |
| | 97 | ヘライワズタ | 35.6 | 8.2 | 1.6 | 0.3 | 31.2 | 7.2 | 0.9 | 0.0 |

結果と考察

吸光度測定の結果、評価を行った10種の藻類種いずれにも溶血活性が認められた。ツルモ、ヒラクサ、スギノリ、コメノリでは、調整試料の1/16濃度段階でも溶血活性が見られ比較的強い活性成分を有することが明らかになった。

個々の海藻類について見てみると、スギノリ(13)では試料(表2では全体と表記)の541nmの吸光度から算出される溶血活性は、87.1%(1/1)、39.8%(1/4)、12.2%(1/16)、2.3%(1/64)と濃度依存的に変化した。また、576nmの吸光度から算出される溶血活性は、83.6%(1/1)、35.4%(1/4)、10.7%(1/16)、1.4%(1/64)と変化した。同様に、マクサ(139)では541nmで58.2%(1/1)、23.2%(1/4)、8.5%(1/16)、1.3%(1/64)、そして576nmで55.6%(1/1)、20.7%(1/4)、8.1%(1/16)、0.4%(1/64)を示した。コメノリ(58)では541nmで65.7%(1/1)、17.2%(1/4)、4.4%(1/16)、0.6%(1/64)、そして576nmで59.8%(1/1)、17.3%(1/4)、3.2%(1/16)、0.0%(1/64)を示した。また、ヒラクサ(45)では541nmで73.3%(1/1)、28.6%(1/4)、18.2%(1/16)、3.2%(1/64)、そして576nmで71.3%(1/1)、27.1%(1/4)、16.4%(1/16)、2.0%(1/64)を示した。すなわち、測定を行った2波長の間で、測定吸光度および算出され

た溶血活性値(Table.3.)には僅かな差はあるものの、評価試料濃度と溶血活性の変化は濃度に依存した傾向で変化していることを示していた。

次いで、ヒラアオノリ(92)とヘライワズタ(97)では微弱な活性を示すことにとどまったが、ヒラアオノリ(92)では541nmで27.6%(1/1)、10.0%(1/4)、2.3%(1/16)、0.2%(1/64)、そして576nmで24.9%(1/1)、8.3%(1/4)、1.2%(1/16)、0.0%(1/64)を、ヘライワズタ(97)では541nmで35.6%(1/1)、8.2%(1/4)、1.6%(1/16)、0.3%(1/64)そして576nmで31.2%(1/1)、7.2%(1/4)、0.9%(1/16)、0.0%(1/64)を示し、濃度依存的に減弱した。その一方で、褐藻のアラメ(10)、ワカメ(118)、紅藻類のツルモ(85)の3種はこれまでと異なった溶血活性のパターンを示した。アラメ(10)では、541nmで35.2%(1/1)、-5.6%(1/4)、2.3%(1/16)、0.3%(1/64)、そして576nmで37.3%(1/1)、-5.9%(1/4)、2.0%(1/16)、0.3%(1/64)を、ワカメ(118)では541nmで29.7%(1/1)、-12.0%(1/4)、-2.3%(1/16)、0.2%(1/64)、そして576nmで31.0%(1/1)、-10.3%(1/4)、-1.6%(1/16)、0.2%(1/64)を示した。そして、ツルモ(85)では、541nmで73.0%(1/1)、15.1%(1/4)、19.0%(1/16)、1.2%(1/64)、そして576nmで70.5%(1/1)、16.2%(1/4)、17.1%(1/16)、0.8%(1/64)を示した。三種の海藻の溶血活性は、抽出試料(1/1)から、4倍希釈を行った(1/4)試料では低下するものの、16倍希釈を行った試料では(1/16)活

性が上昇していた。また、褐藻のアラメ (10)、ワカメ (118) では、抽出原液 (1/1) では、図に示した 541nm の溶血活性判定では、35.2% と 576nm で 37.3% 比較的低い値となっている。また、溶液の性状に関しても、両者はアルギン酸を大量に含む溶液であり、粘性が高い。同様に、紅藻類のツルモ (85) 抽出試料 (1/1) も藻体が柔らかく粉碎が容易であるため同一の処理時間で粘質の高い試料が得られた。これら 3 種の藻類に共通することとして、いずれもの溶血活性が比較的低く、活性の変化が濃度依存的でなく再度希釈することにより溶血活性が上昇することが確認された。これらのことから、いずれも溶血活性を有する物質をもつものの、高分子の多糖類により血球が保護され、結果的に溶血活性が低下するものと推定される。試料濃度を低下されると、大量の多糖類による赤血球保護は持続するものの活性物質濃度の低下が生じるため自然溶血をコントロールとした判定では、溶血活性はマイナスの効果となり赤血球保護作用が見られているものと思われる。再度希釈した希釈液 (1/16) では希釈により多糖類の濃度が低下したため活性物質の作用が観られ溶血活性が再び現れたものと思われる。今後、これらの活性の変化を詳細に解析するとともに、粘着性多糖類の同定を行い、赤血球保護作用について検討を行う予定である。

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。

引用文献

- 1) 四訂日本食品成分表、科学技術庁資源調査会編
- 2) 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, **61**, 3, 361-363 (1987)
- 3) Taichi Usui, Katsuko Asari and Takashi Mizuno. Isolation of highly purified "Fucoidan" from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. *Agric. Biol. chem.*, **44**, 8, 1965-1966 (1980)
- 4) Tmomi Hoshino, Toshimitsu Hayashi, Kyoko Hayashi, Jin Hamada, Jung-Bum Lee and Ushio Sankawa. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 7, 730-734 (1998)
- 5) Dalin Ren, Hiroyuki Noda, Hdeomi Amano, Takahiro Nishino and Kazutoshi Nishizawa. Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fisheries Science*, **60**, 1, 83-88 (1994)
- 6) Shinji Soeda, Yusuke Ohmagari, Hiroshi Shimeno and Atsuno Nagamatsu. Preparation of aminated fucoidan and its evaluation as an antithrombotic and antilipemic agent. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 6, 784-788 (1994)
- 7) 石渡一夫, 静間徹, 中澤博江, 盛英三, 福山直人. 沖縄モズク由来アセチルフコイダンの癌抑制効果. 静脈経腸栄養, **22**, 4, 61-67 (2007)
- 8) 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.
- 9) 長谷川和清, 柴田潔, 荒井千明. 日本産海藻の赤血球に対する溶血作用. 日本歯科大学紀要, 一般教育系, **38**: 51-56. 2009.
- 10) 長谷川和清, 柴田潔, 荒井千明. 日本産海藻の赤血球に対する溶血作用. 2. 日本歯科大学紀要, 一般教育系, **39**: 43-49. 2010.
- 11) 長谷川和清, 柴田潔, 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, **41**: 37-42. 2012.
- 12) 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.* **258**: 373-380. 1987.