植物からのマウス食細胞系 活性化物質の検索

吉沢康子*・登藤博文*・飴谷章夫**
上野川修一**

Mouse Phagocyte-stimulating Substances from Seaweeds and Herbs

Yasuko YOSHIZAWA*, Hirofumi TODOH*,
Akio AMETANI** and Shuichi KAMINOGAWA**

* Research and Development Center,
Showa Sangyo Co. Ltd., 2-20-2,
Hinode, Funabashi, Chiba 273

** Department of Agricultural Chemistry,
The University of Tokyo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113

Substances from 9 edible seaweeds and 8 medicinal herbs, which have been traditionally prescribed in Japan as medicative materials, were screened for stimulating phagocytes by measuring the carbon clearance activity in mice after intraperitoneal injection. Among the tested seaweeds, the ethanol-insoluble fraction of a hot-water extract from *Gracilaria verrucosa* augmented the *in vivo* phagocytic activity. Among the herbs, we also found this effect from the ethanol-insoluble fraction of a hot-water extract from *Actinidia polygama*, and from both the ethanol-insoluble and ethanol-soluble fractions of a hot-water extract from *Polygonatum odoratum*.
(Received Aug. 10, 1993)

近年、ガン治療に対して宿主の免疫応答を修飾することで腫瘍と宿主間の関係に影響を与えて治療効果を生じさせる薬剤が注目を集めており、それら一連の物質はBRM (Biological Response Modifiers) と呼ばれている¹⁾。食品の中にも免疫系を修飾する成分が存在することが報告されており²⁾³⁾、これらの食品の摂取によって生体防御能の強弱が修飾されている可能性は十分に考え得

る。そこで我々は食用海藻や民間薬として用いられてきた植物から、マウスの食細胞系の活性を亢進する物質の検索を腹腔内投与方法で行った。その結果、いくつかの種由来の画分にのみ活性成分の含有が認められたので報告する。このような研究は、最終的には免疫賦活機構の解明のみならず、生体の防御能を亢進する新規食品素材の開発にも有用であると期待できる。

1. 実験方法

(1) 試料

食用に用いられている海藻9種、生薬として用いられている植物8種を対象とし、それぞれ以下の処理を行って供試試料とした。

海藻は水洗、乾燥後粉碎し、50gを85%温メタノール500mlで2回洗浄した後、残渣を減圧濾過回収し、蒸留水750ml (高粘性のものは1500ml)を加えて沸騰水浴中で30分間抽出した。遠心分離(9100×g, 15分)により抽出液を回収した後、抽出残渣に初回と等量の蒸留水を加えて同様に抽出操作をし、得られた抽出液を合わせて減圧濾過 (Toyo No. 5B)により夾雑する固形物を除去した。抽出液にその4倍量の99.5%エタノールを加えて十分攪拌後、室温にて1晩放置した。生じた沈殿を遠心分離により回収し、蒸留水で膨潤後凍結乾燥して供試試料“WF” (water soluble fraction)とした。一方、熱水抽出残渣はさらに蒸留水で洗浄し、蒸留水500mlを加えて塩酸でpH2に調製し、室温で1晩放置した。抽出液を減圧濾過により回収し、水酸化ナトリウムで中和後、WFと同様にエタノール沈殿物を回収し、凍結乾燥して供試試料“AF” (acid soluble fraction)を得た。

生薬は粉碎後海藻と同様に熱水抽出、エタノール沈殿処理を施し、“PF” (ethanol precipitable fraction)を得、さらにエタノール可溶画分を濃縮、乾燥して“SF” (ethanol soluble fraction)を得た。

(2) 活性評価法

活性物質のスクリーニングは、以下の方法で行った。PBS (phosphate buffered saline, 日水製薬製, ダルベッコ PBS (-) 粉末)に溶解した試料を雄性マウス (C57BL/6N, 7~8週齢, 日本クレア(株))に3日間連続腹腔内投与し、最終投与翌日にマウス食細胞系の *in vivo* 活性評価法であるカーボンクリアランス法を用い、Biozziらの方法⁴⁾に準じて活性を測定した。即ち、1.0%ゼラチン (ディフコ) 加PBSで6.25倍希釈した Fount India Ink (ペリカン) 10ml/kgを尾静脈投与し、投与5

* 昭和産業 (株) 総合研究所 (〒273 千葉県船橋市日の出 2-20-2)

** 東京大学農学部農芸化学科 (〒113 東京都文京区弥生 1-1-1)

分及び 12 分後に 10 μ l を尾静脈より採血し、0.1% 炭酸ナトリウム溶液 2 ml 中に吹き込み溶血させた後、600 nm の吸光値を測定し、以下の式に従って食食指数 K を求めた。

$$K = (\log A - \log B) / (12 - 5)$$

A : 5 分後の吸光値, B : 12 分後の吸光値

結果は、コントロール (PBS 投与群) の K 値を 100 として示した。

2. 結果と考察

海藻は食用の大型海藻 9 種を用い、高分子成分特に多糖をターゲットに想定して試料調製を行った。通常、植物のヘミセルロース画分はアルカリ下で抽出されるが、海藻の多くは硫酸多糖を含有することが知られており、多糖中の硫酸基はアルカリ下で容易に脱離する。そこで、熱水抽出されない多糖の抽出を酸性下で試み、熱水抽出エタノール不溶画分 (WF) と、酸性下で抽出されるエタノールに不溶の画分 (AF) を調製した。

カーボクリアランス活性は、通常時間の経過に伴い血中カーボン濃度の対数値が直線的に変化する範囲で直線の傾きを求め、K 値として評価する。ここでは効率的なスクリーニングを行うために、PBS 投与マウス及びポジティブコントロールとして用いたザイモザン A 投与マウスでの予備試験を行い、カーボン投与後 3 分から 15 分の間のカーボン濃度の対数値が直線的に変化することを確認し、5 分及び 12 分に採血して K 値を求める方法を簡易法として用いた。試験は数度に亘って行い、各試験毎にコントロール群を設けて活性を算出し、Student's *t*-test によって有意差検定を行った。

得られた海藻由来の試料のカーボクリアランス活性を図 1 に示した。投与量は 500 mg/kg/day とし、ポジティブコントロールとして用いたザイモザン A は 200 mg/kg/day とした。供試試料の内、ヒジキ、モズク、スギノリ、トサカノリの各 WF 及び AF、フクロフノリ、ワカメ、ナガコンブの WF、マクサ AF の 12 種を投与したマウスは体力が減退し、試験に耐え得なかったため活性は得られなかった。これらのマウスでは、体重減少が激しい、或いは投与した試料が腹腔内に大量に残存している等の異常が認められ、体力の減退はこれらの理由に因ると考えられた。

褐藻の水溶性多糖として抗腫瘍活性のあるラミナラン⁵⁾やアルギン酸、フコイダン⁶⁾が知られており、本試験の試料中にこれらの多糖が抽出されている可能性がある。しかし褐藻の中ではワカメ AF の活性が高い傾向を示したものの有意ではなかった。

紅藻の内、オゴノリ WF 500 mg/kg/day 投与マウスの血中カーボン濃度はザイモザン A 投与マウスに比べ明らかに低値であったが、簡易法で求めた K 値は低値であったため、投与量を 200 mg/kg/day に減じて活性評価を行ったところ、ザイモザン A より強いカーボクリアランス活性が認められた。しかし、その他の紅藻由来の試料に活性は認められなかった。オゴノリには水溶性多糖として硫酸化アガロースが存在することが知られ⁷⁾、アルカリ処理を施して寒天の代替品として用いられており、オゴノリ WF 中にも本多糖が抽出されていると考えられる。また、アガロースの原料であるマクサに強い活性が見いだされなかった点も興味深い。我々は、

図 1 海藻由来供試試料のカーボクリアランス亢進活性

マウス (C57BL/6N) に試料を 3 日間連続腹腔内投与し、最終投与翌日のカーボクリアランス活性を測定し、コントロール (PBS 投与) 群の活性の平均値を 100 として平均値 ± 標準誤差で示した。

*; コントロール群に対して有意差あり ($p < 0.05$)

これまでにスサビノリから得られたポルフィランを主成分とする画分にカーボンクリアランス亢進活性を見いだしており、さらにこの画分が *in vitro* でマクロファージのグルコース消費量及び亜硝酸イオン、インターロイキン1、腫瘍壊死因子産生を亢進することを認めている⁸⁾。ポルフィランも硫酸化アガロース構造を持つことから、オゴノリ WF も類似した活性であると考えられ、今後両者の異同を明らかにしていきたいと考えている。

結果は示さないが、緑藻のアオサ、ヒトエグサから活性画分は得られなかった。

生薬は一般に煎じて飲まれていることから、熱水抽出される成分をエタノール可溶画分と不溶画分に分離し、活性を測定した。投与量は海藻の40%に当たる200 mg/kg/dayとした。また、本試験ではザイモザン A のロットを変えたところ、200 mg/kg/day 投与ではマウスの体力が減退し活性測定ができなかった。そこで100 mg/kg/day としたところ、図1と同等の活性が認められ、ロットによる活性の違いが認められた。生薬8種の中ではマタタビ PF とアマドコロ PF、SF に有意な活性が認められた(図2)。

友田らはこれまでに、多様な生薬から抽出される多糖にカーボンクリアランス亢進能を持つことを報告している⁹⁾。我々も、滋養強壮作用を持つと伝承されている民

間薬の中からマクロファージ活性化作用の報告のない生薬8種を選定して検討した結果、2種から陽性画分が得られた。両者とも水溶性でしかもエタノール不溶性の高分子と思われる画分に活性が認められ、活性成分が多糖である可能性は高いと考えられた。また、今回の試験で陽性率が25%であったことは、伝承されている効能である滋養強壮作用の作用点と食細胞系の活性化との関連性を考える上で興味深い。

3. 要 約

食用海藻9種、民間薬として用いられている生薬8種より、マウスのカーボンクリアランス亢進活性を指標に食細胞系賦活物質の検索を腹腔内投与法で行った。

海藻からはオゴノリの熱水抽出エタノール不溶画分に投与量に依存したカーボンクリアランス亢進活性が認められた。

生薬からはマタタビの熱水抽出エタノール沈殿画分に、アマドコロの熱水抽出エタノール可溶、不溶の両画分に亢進活性が認められた。

終わりに本研究に対し試料をご供与戴きましたオリエンタルファーマシー(株)鈴木重紀博士、三重県水産技術センター柴原敬生先生、また海藻の入手に後尽力下さいました丸真海草(株)の皆様へ心より感謝致します。

図2 生薬由来試料のカーボンクリアランス亢進活性
試験は図1の方法に準じて行った。

*; コントロール群に対して有意差あり ($p < 0.05$)

文 献

- 1) 漆崎一朗 : *Therapeutic Res.*, **11**, 2577 (1990).
- 2) KONG, Z-L., FUKUSHIMA, T., TSUTSUMI, M., IINO, K., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 79 (1992).
- 3) MIWA, M., KONG, Z-L., SHINOHARA, K. and WATANABE, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1863 (1990).
- 4) BIOZZI, G., BENACERRAF, B. and HALPERN, B.N. : *Br. J. Exp. Pathol.*, **34**, 441 (1953).
- 5) 山本一郎 : 化学と薬学の教室, **71**, 2 (1981).
- 6) NODA, H., AMANO, H., ARASHIMA, K., HASHIMOTO, S. and NISHIZAWA, K. : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1265 (1989).
- 7) YAPHE, W. : *Hydrobiologia*, **116/117**, 171 (1984).
- 8) YOSHIZAWA, Y., ENOMOTO, A., TODOH, H., AMETANI, A. and KAMINOGAWA, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1862 (1993).
- 9) 友田正司 : 現代東洋医学, **10**, 10491 (1989).

(平成 5 年 8 月 10 日受理)