

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07879

研究課題名(和文) 若狭湾産の低・未利用食用海藻に含まれる新規抗炎症性成分の探索・精製と性状解析

研究課題名(英文) Search, partial purification and property examination of new anti-inflammatory ingredients included in unused algae from Wakasa Bay

研究代表者

横山 芳博 (Yokoyama, Yoshihiro)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：90291814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：90種以上の若狭湾産藻類を用いて粗抽出液を作製し、抗炎症性に関してスクリーニングを行った。これまで抗炎症性に関する報告の無い褐藻類1種および緑藻類1種を対象に、抗炎症性成分を部分精製するとともに、各試料成分が炎症の指標である一酸化窒素(NO)および腫瘍壊死因子(TNF-)の産生・放出に及ぼす影響を検討した。

褐藻成分は、一定の濃度から障害性を示したが、障害性の無い濃度でNO産生抑制効果を示した。緑藻成分は、細胞に障害を与えず、NO産生抑制効果を示した。また各試料は、細胞培養上清中のTNF-濃度を減少させる抗炎症効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗炎症性を有する食品の摂取によるがんや慢性疾患の抑制は、近年大いに注目されているところである。本研究では、これまで抗炎症性に関する調査報告のない若狭湾産海藻類90種以上を対象として、抗炎症性を検討し、褐藻1種、緑藻1種から抗炎症性成分の部分精製に成功した。部分精製成分を用いて一酸化窒素および腫瘍壊死因子の生成阻害から、それら成分の抗炎症を明らかにした。一般的に流通していない食用可能な緑藻であることから、抗炎症性(健康機能性)を有する体に良い海藻としてのイメージアップが期待される。これは、新たな海藻資源・水産物として、社会的な貢献に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Crude extracts were made from more than 90 kinds of seaweeds living in Wakasa Bay. Using the extracts, we screened the anti-inflammatory effects. We partially purified and characterized the new anti-inflammatory ingredients from two kinds of algae, a brown algae and a green algae.

Components of the brown algae have a cytotoxic effect and also the suppressant effect of nitric oxide (NO) production. Components of the green algae have no cytotoxic effect, but have the suppressant effect of NO production. Both components of the brown and green algae suppresses the production of tumor necrosis factor (TNF-) showing the anti-inflammatory effects.

研究分野：水産化学

キーワード：抗炎症性 海藻 一酸化窒素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) がんと炎症、慢性疾患について

1981年以後、がんは、日本人の死亡要因の第一位を占め、約3人に1人ががんで亡くなっている。がんの要因は食習慣、たばこ、感染症とさまざまであるが、加齢に伴って発生が増加する疾病であるため、平均寿命の長い国では、食事による発がん予防が期待されている。事実、1975年以來、野菜や果物などの植物性食素材の摂取が多彩ながんに予防的であるという疫学調査の結果が次々と示されてきている。特に、亜熱帯産食用植物およびショウガ科、ミカン科、シソ科、セリ科、アブラナ科など、非栄養的に摂取される植物に強い活性を表す種が多いことが示されており、新しい発がん抑制物質の探索が進んでいる。

炎症は、抗原に対する生体の免疫反応であり、炎症は身体の様々な部位で絶えず起こっている。一酸化窒素(NO)は、炎症反応の際にマクロファージ、T細胞などの炎症性細胞より産生される生体防御物質であるが、持続的な炎症反応による過剰なNO産生は、細胞、特に遺伝子の損傷を引き起こし、結果的にがんに繋がることわかってきている。炎症を起こす感染症が原因となる発がんは全体の約10~30%と考えられおり、そのためNO産生を抑制する抗炎症成分の摂取により、発がんを予防することが期待されている。

また、炎症反応において引き起こされるマクロファージの活性化は、NOやプロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub>などの炎症メディエーターを過剰に放出することによって、また、インターロイキン(IL)-1、IL-6および腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ などの炎症促進性のサイトカインを過剰に放出することによって、体細胞に様々なダメージを与える。例えば、過剰な炎症メディエーターやサイトカインは、多くの慢性疾患(糖尿病、アテローム性動脈硬化症、慢性間接リウマチなど)の原因となると考えられている。抗炎症成分の摂取により、これら慢性疾患の予防や症状軽減が期待されている。

#### (2) 申請者のこれまでの研究成果について

申請者は、新規抗炎症性化合物および既知化合物の新しい機能性の発見による低・未利用食用海藻類の健康機能性を有する食品としての有効利用と、その機能性がもたらすイメージ向上を目的として、若狭湾産海藻類の採集と粗抽出液を用いた抗炎症性の有無・強弱の検討を開始した。

これまでに申請者は、若狭湾の福井県沿岸域において、一般的に市場流通しない海藻を採集し、それらの粗抽出液を作製した。幾つかの食用可能な海藻において、強い抗炎症性を有することが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

#### (1) 研究の目的

まず初めに、申請者が新規に強い抗炎症性を認めたこれら低・未利用の食用可能海藻を用いて、新規抗炎症性化合物の発見および細胞レベルにおける抗炎症性作用機序(NO産生阻害のメカニズム)の解明を目指す。藻類抽出液からカラムクロマトグラフィーを用いて、抗炎症成分を精製する。次に、精製された成分が新規化合物であるのか、あるいは、既知化合物であるのか検定する。新規化合物であった場合には、構造解析(構造の推定)を行うとともに、培養細胞レベルでの抗炎症性(NO産生阻害活性)を示す作用機序(情報伝達から炎症メディエーター放出までの一連の反応に対する海藻成分の作用ポイントは何処か)を明らかにする。新規化合物でなかった場合においても、その成分がNO産生阻害活性を有することが知られていない化合物であった場合には、同様に抗炎症性の作用機序を明らかにする。

食用可能な海藻から精製した抗炎症成分が、NO産生阻害活性を有することが知られている既知化合物であった場合には、比較的強い抗炎症性を認めた別の海藻を対象として、抗炎症成分の精製・同定、および、その化合物の抗炎症性作用機序の解明を目指す。

#### (2) 研究の意義

抗炎症性を有する食品の摂取によるがんや慢性疾患の抑制は、近年大いに注目されているところである。本研究の意義は、「これまで抗炎症性に関する調査報告のない若狭湾産海藻類87種を対象として、抗炎症性を検討し、特に抗炎症性が強いことが期待される食用可能な海藻を新規に4種見出した」という実績の上に、「それらを研究対象として抗炎症性成分を精製・同定すること」、さらに、「その成分の抗炎症性の培養細胞レベルにおける作用機序を明らかにすること」にある。新規な高い抗炎症性を有する成分(新規化合物)が発見された場合には、健康機能性成分や医薬品などとしての利用・展開が大いに期待される。

一般的に流通していない海藻を検討対象としていることも、本研究の特徴的な点である。新規化合物でなかった場合であっても、特に食用可能な海藻であることから、抗炎症性(健康機能性)を有する体に良い海藻としてのイメージアップが期待される。これは、新たな海藻資源・水産物として、漁業者への貢献に繋がるが大いに期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 成分の分離と同定

NO 産生阻害活性成分の単離精製と同定：これまでの申請者の研究から明らかになっている食用可能海藻を対象として、NO 産生阻害化合物の精製を試みる。

NO 産生阻害活性：NO 産生刺激剤である大腸菌 LPS およびマウス IFN- $\gamma$  で活性化したマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 (ATCC) の NO 産生を阻害する活性で評価する。終濃度 70% となるようにメタノールを加えて調製した粗抽出液を出発材料として、分取クロマトグラフィーおよび分取 HPLC を用いて、含有される成分を分離分画する。溶離液の NO 産生阻害活性を示す画分を回収し、用いるカラムの種類（順相、逆相など）を変えてクロマトグラフィーを繰り返し、NO 産生阻害活性成分を精製する（以下、海藻抽出成分と呼ぶ）。精製した海藻抽出成分が既知であるか否か、申請者の所属する学部を設置される 4 重極型高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS、LS/MS/MS）を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) スクリーニングと精製

平成 29 年度までに、若狭湾の福井県沿岸域において、一般的に市場流通しない約 90 種類の海藻を採集し、それらの粗抽出液を用いて抗炎症性を検討した。その結果、ほとんど、または、全く市場流通しないが食用可能な 4 種の食用可能な海藻において、強い抗炎症性を有することが明らかとなった。それら 4 種の抗炎症性の強さは、極めて強い抗炎症性で知られているウコンと同等レベルであった。また、その他にも 13 種の食用可能な海藻において、比較的強い抗炎症性を認めた。さらに、強い抗炎症を示した紅藻の一種を大量に採取し、中圧カラムクロマトグラフィーを用いてその抗炎症成分の単離を試みた。HPLC による分離結果より、対象とした紅藻には少なくとも 2 つの異なる抗炎症成分が含まれていることが示唆された。LC/MS および LC/MS/MS の結果より、HPLC により分離された一つのピークの成分は残念ながら抗炎症性が既に報告されている既知成分であった。

スクリーニング実験で一定の抗炎症活性を示し、これまで抗炎症性に関する報告の無い褐藻類 1 種および緑藻類 1 種を新たな研究対象に選択し、実験を進めた（表 1）。これらの海藻類が示した抗炎症活性を再確認し、更なる作用機序の解明および成分の分離・特定による有効活用を目標として、各試料の成分が NO および TNF- $\alpha$  の産生・放出にどのような効果を示すかを検討した。その結果、褐藻成分は、一定の濃度から障害性を示したが、障害性の無い濃度で NO 産生抑制効果を示した。緑藻成分は、細胞に障害を与えず、NO 産生抑制効果を示した。また各試料は、細胞培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度を減少させる抗炎症効果を有することが明らかとなった（表 2）。

表1. 各試料における細胞障害性およびNO産生抑制効果

	クルクミン溶液 ( $\mu$ M)					
	10	20	25	50	100	200
細胞相対生存率 (%)	95.78 $\pm$ 8.67	97.08 $\pm$ 8.68	92.59 $\pm$ 10.45	28.90 $\pm$ 6.45	7.09 $\pm$ 4.55	9.41 $\pm$ 2.04
NO産生抑制率 (%)	24.58 $\pm$ 3.15	78.88 $\pm$ 1.65	79.66 $\pm$ 3.18	99.55 $\pm$ 1.29	99.03 $\pm$ 1.23	98.67 $\pm$ 6.13
	褐藻抽出物 (mg/ml)					
	0.025	0.031	0.042	0.063	0.13	0.25
細胞相対生存率 (%)	104.10 $\pm$ 29.93	66.68 $\pm$ 3.10	72.56 $\pm$ 14.8	15.34 $\pm$ 9.33	13.72 $\pm$ 3.49	20.39 $\pm$ 4.16
NO産生抑制率 (%)	39.66 $\pm$ 13.53	86.57 $\pm$ 9.28	95.85 $\pm$ 2.45	97.53 $\pm$ 0.75	91.61 $\pm$ 1.56	83.97 $\pm$ 4.11
	緑藻抽出物 (mg/ml)					
	0.040	0.050	0.067	0.10	0.13	0.20
細胞相対生存率 (%)	159.76 $\pm$ 31.83	172.18 $\pm$ 10.35	164.77 $\pm$ 7.60	175.62 $\pm$ 7.52	176.03 $\pm$ 12.42	158.30 $\pm$ 15.75
NO産生抑制率 (%)	18.80 $\pm$ 4.090	17.83 $\pm$ 6.85	29.25 $\pm$ 2.13	35.40 $\pm$ 5.54	50.15 $\pm$ 0.20	67.010 $\pm$ 1.48

表2. 各試料におけるTNF- $\alpha$ 放出抑制効果

	control	褐藻抽出物 (mg/ml)					
		0.042	0.050	0.063	0.083	0.13	0.25
TNF- $\alpha$ 濃度 (mg/ml)	480.88 $\pm$ 2.21	451.85 $\pm$ 31.44	481.93 $\pm$ 25.21	449.93 $\pm$ 9.39	413.37 $\pm$ 13.25	204.27 $\pm$ 12.11	187.43 $\pm$ 67.41
	control	緑藻抽出物 (mg/ml)					
		0.040	0.050	0.067	0.10	0.13	0.20
TNF- $\alpha$ 濃度 (mg/ml)	450.95 $\pm$ 6.67	404.19 $\pm$ 46.01	428.37 $\pm$ 26.36	420.17 $\pm$ 27.13	410.58 $\pm$ 12.94	324.39 $\pm$ 59.43	361.98 $\pm$ 13.64

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田上真衣・大崎泰貴・細井公富・水田尚志・○横山芳博
2. 発表標題 若狭湾産海洋生物資源に由来する抗炎症成分
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山芳博
2. 発表標題 若狭湾産低・未利用の海洋資源生物に含まれる生理活性物質
3. 学会等名 日本食品機械研究会フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐彩香・細井公富・水田尚志・神谷充伸・横山芳博
2. 発表標題 若狭湾産海藻類における生理活性成分の研究
3. 学会等名 平成29年度日本水産学会中部支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横山芳博
2. 発表標題 海の厄介ものとその利用
3. 学会等名 日本食品機械研究会フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五十嵐彩香・細井公富・水田尚志・神谷充伸・横山芳博
2. 発表標題 若狭湾産海藻類に含まれる生理活性物質の探索 1
3. 学会等名 第9回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 及川 聡美・細井 正富・水田 尚志・神谷 充伸・横山 芳博
2. 発表標題 若狭湾産海藻類に含まれる生理活性物質の探索 2
3. 学会等名 第9回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 田上真衣・細井正富・水田尚志・神谷充伸・高橋正和・横山芳博
2. 発表標題 若狭湾産海藻に含まれる新規抗炎症成分の探索と精製
3. 学会等名 平成28年度 日本水産学会中部支部大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	細井 公富  (Hosoi Masatomi)  (70410967)	福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授   (23401)	