海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用（1）

-スサビノリにおける抗炎症作用の探索-

食品工業部
柘植圭介　鶴田裕美　佐藤真佐恵
吉村臣史

有明海は，海苔（スサビノリ）の有数の産地として知られている．養殖されたスサビノリはほとんどが板海苔に加工されているが，国内の板海苔市場は既に飽和しており，板海苔に限定されない新たな市場開拓が期待されている．そこで，本研究では，機能性食品原料としてのスサビノリの用途開発を志向して，スサビノリ由来低分子成分の抗炎症作用を検証した．マウス由来 RAW264.7 細胞を大腸菌由来 LPS で刺激して NO 及びサイトカイン発現を誘導させ，種々の有機溶媒で抽出したスサビノリ抽出物の共存効果をみたところ，methanol 抽出物，ethanol 抽出物及び chloroform 抽出物に強い NO 及びサイトカインの産生抑制が認められた．次に，強い抑制作用を示した ethanol 抽出物を分画して NO/サイトカイン産生抑制作用を評価したところ，分画物のうちリン脂質及び糖脂質画分に抑制作用が認められた．リン脂質画分の NO/サイトカイン産生抑制作用は phospholipase 処理により減失したことから，スサビノリには活性化マクロファージによる炎症性メディエーターの産生を抑制する成分が含まれ，少なくともリン脂質がその関与成分であることが示唆された．

１．はじめに

炎症は，病原菌の感染等により，生体が内外から有害な刺激を受けたときに生じる防御反応である．発熱や発赤などの炎症応答の発動に重要なのは,「自然免疫」と呼ばれる生体による異物の特異的な認識機構である．マクロファージは自然免疫に関わる多機能性の白血球で，生体に侵入してきた異物を認識・排除するセンサーとしてのはたらきがある．例えば，グラム陰性菌細胞壁の構成成分であるリポ多糖（LPS）は，マクロファージにより認識され，炎症反応の引き金となる様々な物質の放出を促すことが知られている．

マクロファージによる LPS の認識は，細胞表面又は内部の toll 様受容体（TLR）[1]への LPS の結合によって引き起こされる [2]．LPS が結合した TLR は，細胞内シグナル伝達経路を介して転写因子を活性化し，一酸化窒素（NO），プロスタグランジンなどの生理活性物質や，種々の炎症性サイトカインなどの炎症性メディエーターの発現誘導を促すこと [3-5]が知られている．NO は，生体内で多彩な生理作用を示し，血管の拡張や神経伝達，性機能などに関わっているが，殺菌物質として活性化したマクロファージからも多量に産生され，ときとして酸素ラジカルとの反応生成物（peroxinitrite）による強い毒性により，自己の組織障害を引き起こす [6]．サイトカインの一種である tumor necrosis factor-α (TNF-α)や interleukin-6 (IL-6) もまた TLR へのリガンドの結合を介して発現誘導され，アポトーシスの誘導 [7]や炎症性シグナルの伝達 [8),9)]などにはたらくことで感染防御に作用するが，バランスの崩れた過剰な発現は関節リウマチ [10)]やインスリン抵抗性 [11)]などの生活習慣病の進展を招く．

近年，がんや生活習慣病などの慢性疾患の病態形成に,「慢性炎症」が深く関わっていることが注目されている [12)]．慢性炎症では，酸化ストレスなどの刺激を受けた臓器の細胞から放出される自己由来の成分（内因性リガンド）が，マクロファージ等の細胞に発現する TLR により認識されて, 恒常的な炎症反応を誘導すると考えられている．TLR を介したマクロファージの活性化に影響を及ぼす様々な外因性/内因性リガンドが見つかっており [13)]，それらは免疫機能の制御にはたらく食品や医薬，あるいは免疫系のメカニズムを解明するためのツールとしての活用が期待されている．

海藻類は，アジア地域，とりわけ日本において長い食の歴史を有する食品である．海藻類は，食用のみならず，化粧品や飼肥料，増粘剤・ゲル化剤としても幅広く利用されている．最近では，生活習慣病の予防効果など，海藻成分の健康維持機能が注目されている．スサビノリ（*Porphyra yezoensis*）は紅藻類に属する海藻の一種で，干満の差が激しい岩礁地帯に自生するが，有明海を始めとする栄養塩が豊富

な干潟や湾内で盛んに養殖されており，日本国内における年間の生産量は 35 万トンに達する [14]．これは，国内における海藻類の中で最多の量である．

これまで，スサビノリ構成成分の摂取による様々な生理作用が報告されている．例えば，スサビノリの細胞間多糖類であるポルフィラン [15]には，抗腫瘍活性 [16]や脂質代謝改善作用 [17], 抗アレルギー作用 [18]などが報告されている．また，タウリンにおける脂質代謝の改善作用 [19]，フロリドシドにおけるプロバイオティクス作用 [20]，紫外線吸収物質 porphyra-334 誘導体における抗酸化作用 [21]など，スサビノリに含まれる低分子成分にも種々の生理作用があることが報告されている．

有明海はスサビノリの有数の産地として知られ，なかでも佐賀県における養殖規模は，国内最大を誇っている．他方，養殖されたスサビノリのほとんどが板海苔に加工されているが，国内の板海苔市場は既に飽和しており，板海苔に限定されない新たな用途の開発による新規市場の開拓が求められている．また，板海苔の中でも色が薄いものや，板海苔加工時に発生する屑海苔など，板海苔として利用が困難なものが発生しており，これらの有効活用も期待されている．

以上の背景より，佐賀県では，機能性食品素材としてのスサビノリの健康維持機能の探索と有効活用に関する研究を実施している．本稿では，慢性炎症の予防効果が期待されるスサビノリ由来の食品素材の開発を志向し，マクロファージ系培養細胞を用いた in vitro の系で, LPS 誘導型マクロファージの炎症性メディエーター産生に及ぼすスサビノリ抽出物の影響について検討した結果について報告する．

２．実験方法

2.1 材料及び試薬

スサビノリとして 2010 年度有明海産板海苔（三福海苔株式会社）を用いた．スサビノリを超遠心粉砕機（ZM-1; Retsch 製）で粉砕し，粒子径 125 μm 以下の微粉末を得た．品質の劣化を防ぐため，微粉末は密封下-18℃で保管した．

本研究における試薬は以下のものを用いた：penicillin/streptomycin（Life Technologies Gibco），ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Scientific HyClone), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 和光純薬工業) , LPS（*Escherichia coli* 0111:B4 由来; 和光純薬工業), dimethyl sulfoxide (DMSO; ナカライテスク), mouse TNF-α ELISA Kit (Mouse ELISA Ready-SET-Go!; Affymetrix eBioscience), Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所), クロマトグラフィー用シリカゲル (Wakogel C-300HG; 和光純薬工業), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (PO-PG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine (PO-PE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidic acid (PO-PA), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylserine (PO-PS), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (PO-PC), 1-palmitoyl-2-hydroxy-phosphatidylcholine (P-LPC) (以上 6 点総て Avanti Polar Lipid), phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich Co), RIPA buffer (Cell Signaling Technology), Laemmli SDS-PAGE sample buffer (Bio-Rad), anti-mouse iNOS rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology), anti-mouse COX-2 rabbit polyclonal antibody (Enzo Life Sciences), anti-mouse GADPH rabbit polyclonal antibody (Gene Tex), alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG goat polyclonal antibody (Life Technologies Invitrogen). 化学発光基質 (Western-SuperStar; Life Technologies Invitrogen), phospholipase A1 (*Thermomyces lanuginonus* 由来; Sigma-Aldrich Co), phospholipase A2 (*Naja mossambica mossambica* 由来; Sigma-Aldrich Co) , phospholipase C (*Clostridium perfringens* 由来; Sigma-Aldrich Co). また，有機溶媒及び酸・アルカリ試薬は，特に記載しない限り和光純薬工業製の特級試薬を用いた．

2.2 抽出液の調製

極性の異なる 7 種類の有機溶媒（methanol, ethanol, acetone, chloroform, ethyl acetate, petroleum ether, *n*-hexane）を用いて，スサビノリ微粉末より抽出液を調製した．ねじ口試験管に入れた 1 g の試料に 10 mL の溶媒を添加し，常温にて 1 時間撹拌した．これを遠心分離（1,500 x g, 10 分）し，抽出液を回収した．抽出残渣に再度 10 mL の溶媒を加え，常温にて 1 時間撹拌した．遠心分離により抽出液を得，第一の抽出液と合わせてこれを遠心濃縮し，乾固物を秤量して抽出率を算出した．乾固物に抽出溶媒を加えて抽出物の濃度を 20 mg/mL とし，-40℃で保管した．

2.3 細胞培養

マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7（理研バイオリソースより提供）を用いて細胞試験を行った. 細胞は 1% penicillin/streptomycin, 10% FBS 含有 DMEM 培地により 5%CO_2 存在下 37℃で継代培養した．LPS 誘導型 NO 及び TNF-αの産生試験は，既報 [22]に若干の変更を加え，以下の条件で行った．

細胞を 2×10^5 cells/mL の細胞密度になるよう培地で希釈し，細胞培養用 96 well プレートに 200 μL ずつ分注して 16 時間前培養し，細胞をプレートに接着させた．細胞より培養上清を除去し，新鮮な培地で洗浄後，所定の濃度にて試料を分散させた培地を 180 μL 添加し，さらに 15 分後に LPS を 20 μL 添加して総量 200 μL で培養した（$n = 3$）．培養 6 時間並びに 19 時間後の培養上清を採取し，TNF-α濃度（培養 6 時間後）及び NO 濃度（培養 19 時間後）を測定した．試料は溶媒を乾固させた後に 50 mg/mL の濃度で一旦 DMSO に溶解し，その後所定の濃度になるよう培地に分散させた．DMSO の細胞毒性を考慮し，培地における DMSO の終濃度が 0.2%を超えないようにした．TNF-α濃度は ELISA 法により求めた．試料添加培地の代わりに同一の DMSO 濃度に調整した試料無添加培地を添加したものをコントロール，LPS 含有培地の代わりに LPS 無添加培地を添加したものをブランクとし，TNF-α産生抑制活性の度合い（阻害率）を以下の式で算出した．

TNF-α産生阻害率 (%)={1–(Sa–Sb)/ (Sc–Sb)}×100

ここで,

Sa：試料添加培地における TNF-α濃度

Sb：ブランクの TNF-α濃度

Sc：コントロールの TNF-α濃度.

他方，NO 産生量は，Griess 法 [23]により培養上清に蓄積した亜硝酸イオン（NO_2^-）濃度を測定することにより算出した．すなわち，培養上清 125 μL を 96 well マイクロプレートに採取し，Griess 試薬を 125 μL 添加して速やかに撹拌し，10 分室温放置後マイクロプレートリーダー（Molecular devices 製 M5；平成 18 年度電源立地地域対策交付金補助）にて波長 500 nm と 650 nm における吸光度差（ΔA）を測定した．培地に NO_2^-を溶解させたものを標準液として検量曲線を作成し，培地中の NO_2^-濃度を求めた．NO 産生阻害率は，TNF-α産生阻害率と同様に以下の式で算出した．

NO 産生阻害率 (%)={1–(ΔAa–ΔAb)/(ΔAc–ΔAb)}×100

ここで,

ΔAa：試料添加培地の吸光度差

ΔAb：ブランクの吸光度差

ΔAc：コントロールの吸光度差.

各試料添加区のコントロール区に対する産生阻害率の差は，Dunnett の多重比較により検定した．

2.4 細胞傷害性

細胞試験による NO/ TNF-α産生抑制の妥当性を確認するべく，細胞活性測定キット（Cell Counting Kit-8）[24]を用いて，試料の細胞障害性を測定した．2. 3 と同一の培養条件で試料及び LPS の存在下 20 時間細胞培養し，培地を一旦除去後，Cell Counting Kit-8 を含む培地（2 μL reagent/98 μL medium）で 6 時間培養し，マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm と 650 nm における吸光度差（ΔA）を測定した．細胞傷害性の程度は，コントロール区における ΔA に対する試料添加培地区のΔA の比で表した．

2.5 分画

細胞試験において強い NO/TNF-α産生抑制を示した ethanol 抽出物を，液液分配並びに固相抽出 (SPE) にて分画した．乾固した抽出物 1g を 80 mL の chloroform/methanol/water = 1/2/0.8 (v/v) に溶解させ，分液ロートに入れた．20 mL の chloroform 並びに水を添加して 30 分振盪し，4℃で一晩静置した．水層及び有機層をそれぞれ分取し，溶媒を留去して秤量後，50% ethanol（水層）あるいは chloroform（有機層）に再溶解させた．

さらに，シリカゲルを用いた固相抽出法 [25]に基づき，有機層を，非極性脂質や色素が分配される chloroform 溶出画分，糖脂質が分配される acetone 溶出画分及びリン脂質が分配される methanol 溶出画分に 3 分画した．すなわち，chloroform で平衡化したシリカゲルカラム（ゲル容量 20 mL）に有機層画分（200 mg in 5 mL chloroform）を注入し，chloroform, acetone 及び methanol（各々200 mL）で順次溶出させ，溶媒を留去して秤量した後に少量の溶出溶媒に溶解させて-40℃で保管し，細胞試験に供した．

2.6 薄層クロマトグラフィー

ethanol 抽出物並びにその分画物を薄層クロマトグラフィー (TLC) に供した．各試料 (150 μg in 10 μL solvent) を TLC プレート (Silica gel-60 TLC aluminum plates, Merck Germany) に塗布し，chloroform/methanol/water/triethylamine=30:35:7:35 (v/v)で展開した [26]． 展開後のプレートは以下の３種類の検出試薬で発色させた: (1) 50% sulfuric acid 試薬, (2) Dittmer-Lester 試薬 [27]（リン脂質の検出）(3) diphenylamine (DPA) 試薬 [28]（糖脂質の検出）. 併せて，6 種類のリン脂質クラスを含む標準リン脂質（PO-PG, PO-PE, PO-PA, PO-PS, PO-PC, P-LPC）の混合物も展開し，得られたバンドの Rf 値から，試料中のリン脂質クラスを推定した．

2.7 ウェスタンブロッティング

LPS 誘導型 RAW264.7 細胞における誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）及びシクロオキシゲナーゼ-2

表１　スサビノリ各種抽出物の収率、活性化マクロファージのNO/TNF-α産生抑制作用及び細胞障害性

	Acetone	Petroleum ether	Chloroform	Methanol	Ethanol	Ethyl acetate	*n*-Hexane
Yield of extracts (%)	3.1	1.0	2.5	15.4	12.1	0.9	2.1
Inhibition rate (%)							
Nitric oxide	38.4 ± 4.5	-29.4 ± 26.4	71.8 ± 4.7 **	60.4 ± 7.8 **	91.7 ± 2.4 **	-6.8 ± 15.6	-42.1 ± 13.9 *
TNF-α	15.8 ± 6.8	9.8 ± 8.9	36.5 ± 4.7 *	50.2 ± 8.5 **	41.1 ± 10.4 **	14.0 ± 1.8	3.8 ± 4.5
Cell viability (%)	100.2 ± 1.5	101.6 ± 2.0	102.0 ± 2.8	102.2 ± 0.8	101.1 ± 1.8	99.1 ± 2.9	103.8 ± 4.1

スサビノリより得た各種抽出物をDMSOに溶解させ, 終濃度100 μg/mLでRAW264.7細胞（4×10^4 cells/well, in 96 well microplate）に添加した. LPSを終濃度10 ng/mLで添加してNO及びTNF-αの産生を誘導し, 抽出物添加の影響を抽出物無添加（DMSO単独投与）に対する産生阻害率で表した. *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test, vs control).

（COX-2）のタンパク質発現に及ぼすノリ分画物の影響を, ウェスタンブロッティングにより測定した. RAW264.7 を細胞培養用 6 well プレートに 4×10^5 cells/mL の細胞密度で 3 mL 添加して 16 時間前培養した．細胞より培養上清を除去し，新鮮な培地で洗浄後，所定の濃度にて試料を分散させた培地を添加し，さらに 15 分後に LPS 入り培地（終濃度：10 ng/mL）を添加して総量 3 mL とし，19 時間培養した．培養上清を取り除き，PBS(-)で細胞を洗浄してから 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride 含有 RIPA buffer 0.5 mL を添加し，細胞を剥離・溶解させた. RIPA buffer を回収し, 氷冷下超音波処理（Sonifier 150, Branson 製）により細胞を破砕し，遠心分離（20,000 x g, 5 分）により不溶物を取り除き，細胞溶解液を得た．細胞溶解液中のタンパク質を 0.5 mol/L trichloroacetic acid 存在下沈殿させ，さらに冷 Acetone で洗浄後，50 μL の Laemmli SDS-PAGE sample buffer (5% β-mercaptoethanol 含有) 並びに 2 μL の 1 mol/L ammonium hydrogen carbonate を添加してタンパク質を再溶解させ, 100℃5 分処理によりタンパク質を還元して SDS-PAGE 用試料とした.

この試料 10 μL をプレキャストゲル（Mini-Protean TGX, 4-20%, Bio-Rad 製）にアプライし，SDS-PAGE に供した．電気泳動後のゲルのブロッティングは iBlot 7-Minute Blotting System (Life Technologies 製)にて行い，PVDF 膜に転写されたタンパク質を下記の条件で免疫染色した.

一次抗体：anti-mouse iNOS rabbit 抗体及び anti-mouse COX-2 rabbit 抗体.

二次抗体: alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG 抗体.

検出：化学発光検出.

内在性コントロール抗体：anti-mouse GAPDH rabbit 抗体 [29].

2.8 Phospholipase 処理

リン脂質を含む methanol 溶出物 をリン脂質分解酵素（phospholipase A1, phospholipase A2 あるいは phospholipase C）で処理してこれを in vitro 試験に供し，NO/サイトカイン産生抑制活性に及ぼすリン脂質の寄与効果について検証した. ねじロバイアル（4 mL 容）中で乾固させた methanol 溶出物 (1.5 mg) を 2 mL の diethyl ether/methanol = 98/2 (v/v). に分散させ，各酵素の acetate buffer (50 mmol/L, pH6.0) 溶液を添加して常温下 6 時間撹拌した．試料，溶媒及び酵素無添加の acetate buffer を混合して同一条件で撹拌したものをコントロール試料とした.

酵素反応溶液及びコントロール試料溶液を遠心濃縮により乾固し，DMSO に 50 mg/mL の試料濃度で再溶解させた後に 1 mg/mL になるよう 1% penicillin/streptomycin, 10% FBS 含有 DMEM 培地に希釈し，2.3 と同様の条件で in vitro 試験に供した.

３．結果

3.1 抽出物の活性比較

表 1 に各抽出物における収率，マクロファージの LPS 誘導型 NO 産生阻害率，TNF-α産生阻害率及び細胞障害性を示した．試験した 7 抽出物の中で，コントロールに対して有意に強い NO 産生阻害並びに TNF-α産生阻害を示したのは，chloroform 抽出物，methanol 抽出物並びに ethanol 抽出物であった. acetone 抽出物においても NO 産生並びに TNF-α産生の抑制が認められたが，その差はコントロールに比して有意なものではなかった．他方，*n*-hexane 抽出物は逆に NO 産生を促進した．抽出物の収率は methanol 抽出物が最も高く, 次いで ethanol 抽出物が高かった. WST 活性はいずれの抽出物においてもコントロールと変わらず，これらの抽出物の中で RAW264.7 に対して 100 μg/mL の濃度で障害性を示すものはないと判断された.

3.2 分画物の収率及び活性

3.1 の結果を受け, 強い NO/TNF-α産生阻害を示した ethanol 抽出物を chloroform/methanol/water の系で液液分配し，また有機層に分配される疎水性画分についてはシリカゲルを用いた SPE によりさらに細分

画した. 各々の分画物の収率を表 2 に示した. ethanol 抽出物の水層（親水性画分）並びに疎水性画分への分配率はそれぞれ 36.9wt%並びに 64.5wt%であった. また, 疎水性画分の SPE による chloroform 溶出画分, acetone 溶出画分並びに methanol 溶出画分への分配率は, それぞれ疎水性画分を 100wt%として 25.8wt%, 44.8wt%並びに 27.5wt%であった.

表 3 に，各分画物における NO 産生阻害率を示した. NO 産生阻害は疎水性画分の方にのみ認められ, その作用は濃度依存的であった．また，疎水性画分から得た 3 分画物の中では acetone 溶出物及び methanol 溶出物の両方に同程度の阻害活性が認められ，その作用は濃度依存的であった．表 4 に各分画物における TNF-α産生阻害率を示した．NO の場合と同様，TNF-α産生においても，阻害活性が認められたのは疎水性画分のみであった．また，細かく分画された 3 画分のうち，acetone 溶出画分及び methanol 溶出画分は濃度依存的に TNF-α産生を抑制し，NO 産生阻害の場合と同様の傾向を示した．なお, 細胞傷害性はどの試料区においても認められず, スサビノリ由来試料に見出された NO/ TNF-α産生阻害は，細胞そのものに対する障害性によるものではないと判断された（データは示さず）.

表２　スサビノリethanol抽出物の液液分配および固相抽出における分画物の収率

	Yield-1	Yield-2	Yield-3
		wt%	
Ethanol extract	12.1	100.0	
Water layer (hydrophilic)	4.5	36.9	
Organic layer (lipophilic)	7.8	64.5	100.0
Chloroform eluate	2.0	16.6	25.8
Acetone eluate	3.5	28.9	44.8
Methanol eluate	2.1	17.7	27.5

Yield-1, ノリ粉末を100とした時の収率; Yield-2, Ethanol抽出物を100とした時の収率; Yield-3, 有機層を100とした時の収率.

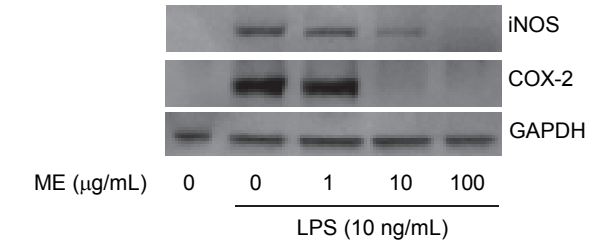

図１　活性化マクロファージにおけるiNOS及びCOX-2発現誘導に及ぼすmethanol溶出物の影響

Methanol溶出物 (ME) をDMSOに溶解させ, 終濃度1-100 μg/mLでRAW264.7細胞（1.2×10^6 cells/well, in 6 well plate）に添加した. Cell lysateをwestern blottingに供して，LPSにより誘導されたiNOS及びCOX-2のタンパク質発現量を評価した.

表３　活性化マクロファージにおけるNO産生に及ぼす各種スサビノリ分画物の影響

Level (μg/mL)	% Inhibition of nitric oxide production					
	Ethanol extract	Solvent partition		SPE fractionation		
		Hydrophilic	Lipophilic	Chloroform eluate	Acetone eluate	Methanol eluate
0.1	0.5 ± 5.3	-1.2 ± 7.5	-4.2 ± 4.7	-7.2 ± 14.9	8.8 ± 7.3	21.2 ± 9.5
1	7.3 ± 5.2	11.2 ± 5.8	13.0 ± 8.2	6.6 ± 8.2	34.2 ± 9.2 *	57.4 ± 4.7 **
10	29.0 ± 6.7 **	11.6 ± 2.0	67.5 ± 4.9 **	-2.4 ± 6.2	62.5 ± 2.4 **	84.1 ± 7.1 **
100	72.7 ± 5.0 **	6.9 ± 2.4	73.8 ± 2.6 **	-5.7 ± 11.5	70.4 ± 5.3 **	71.0 ± 3.0 **

スサビノリethanol抽出物より得た各種分画物をDMSOに溶解させ, 終濃度0.1-100 μg/mLでRAW264.7細胞（4×10^4 cells/well, in 96 well microplate）に添加した. LPSを終濃度10 ng/mLで添加してNOの産生を誘導し, 抽出物添加の影響を抽出物無添加（DMSO単独投与）に対する産生阻害率で表した. *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test, vs control).

表４　活性化マクロファージにおけるTNF-α産生に及ぼす各種スサビノリ分画物の影響

Level (μg/mL)	% Inhibition of TNF-alpha production					
	Ethanol extract	Solvent partition		SPE fractionation		
		Hydrophilic	Lipophilic	Chloroform eluate	Acetone eluate	Methanol eluate
0.1	7.9 ± 3.5	-1.7 ±11.6	44.2 ± 7.5 *	11.9 ± 2.5	8.3 ± 6.9	28.4 ± 5.5
1	7.7 ±18.7	0.0 ±11.4	53.8 ± 2.2 **	-2.8 ± 8.9	27.3 ± 2.5 **	37.0 ± 2.5 **
10	36.0 ± 3.0	-12.3 ± 0.5	56.2 ± 2.0 **	-3.6 ± 5.7	43.2 ± 4.0 **	46.6 ± 4.8 **
100	41.9 ±12.4 *	2.2 ± 3.8	58.6 ± 4.0 **	8.8 ± 8.9	55.9 ± 5.8 **	72.8 ± 2.2 **

スサビノリethanol抽出物より得た各種分画物をDMSOに溶解させ, 終濃度0.1-100 μg/mLでRAW264.7細胞（4×10^4 cells/well, in 96 well microplate）に添加した. LPSを終濃度10 ng/mLで添加してTNF-αの産生を誘導し, 抽出物添加の影響を抽出物無添加（DMSO単独投与）に対する産生阻害率で表した. *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test, vs control).

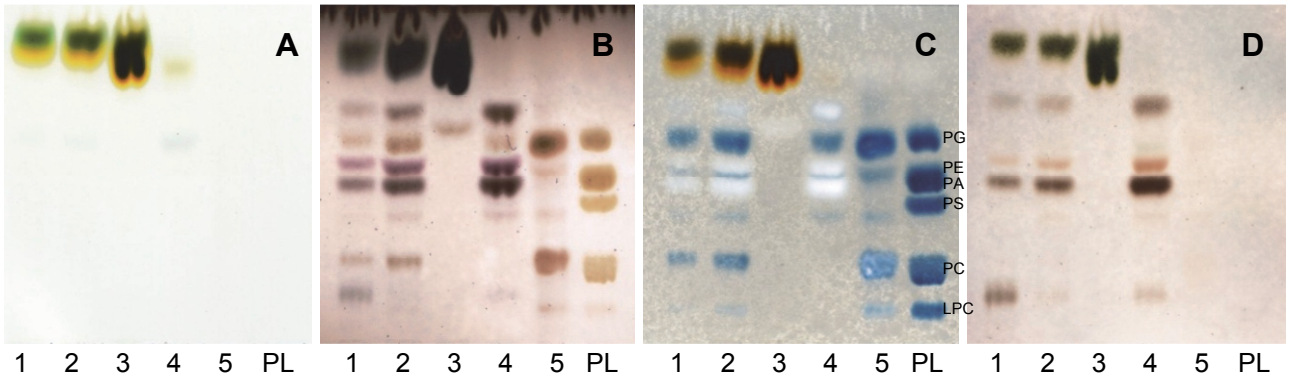

図２　スサビノリethanol抽出物およびその分画物の薄層クロマトグラフィー

展開条件: 固定相, Silica gel-60; 移動相, chloroform/methanol/water/triethylamine=30:35:7:35 (v/v); 試料塗布量, 150 μg.
A, 検出試薬なし; B, 50% sulfuric acid + 180℃加熱; C, Dittmer-Lester試薬; D, DPA試薬 + 120℃加熱; lane 1, ethanol抽出物; 2, ethanol抽出物→有機層画分; 3, 有機層画分→chloroform溶出画分; 4,有機層画分→acetone溶出画分; 5,有機層画分→methanol溶出画分; PL, リン脂質標準品. Rf値: PG (PO-PG), 0.60; PE (PO-PE), 0.51; PA (PO-PA), 0.47; PS (PO-PS), 0.42; PC (PO-PC), 0.22; LPC (P-LPC), 0.10.

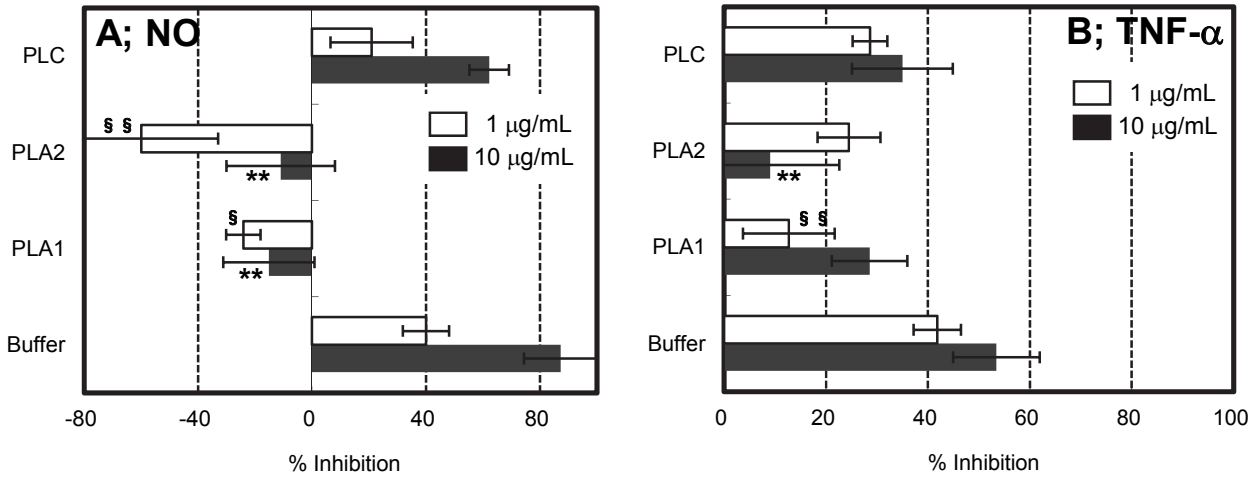

図３　スサビノリ-リン脂質画分のNO/TNF-α産生抑制作用に及ぼす各種リン脂質分解酵素処理の影響

リン脂質画分をリン脂質分解酵素もしくは酵素無添加のbufferにてインキュベートし, 活性化マクロファージのNO/TNF-α産生抑制作用を比較した. 試料を終濃度1もしくは10 μg/mLにてRAW264.7 (4×10^4 cells/well, in 96 well microplate) に添加した後, LPS (10 ng/mL) で刺激し, NO/TNF-αの産生阻害率を酵素添加区と無添加区とで比較した.
A, NO産生阻害率; B, TNF-α産生阻害率; Buffer, リン脂質分解酵素無添加 (bufferのみ); PLA1, phospholipase A1; PLA2, phospholipase A2; PLC, phospholipase C. **p<0.01 vs control (10 μg/mL sample); §p<0.05, §§p<0.01 vs control (1 μg/mL sample) .

3.3 ウェスタンブロッティング

Methanol 溶出画分について，LPS により誘導される 2 つの酵素（iNOS 及び COX-2）のタンパク質発現に及ぼす影響をウェスタンブロッティングにより評価した．その結果，図 1 に示すように，LPS の添加により iNOS 及び COX-2 の両酵素の発現誘導が認められたが, 10 μg/mL 以上の methanol 抽出物添加により，LPS による両酵素の発現誘導が明らかに抑制された. 他方, 内在性コントロールである GAPDH の発現量はLPS及び試料の添加にかかわらず一定であった.

3.4 TLC

図 2 に ethanol 抽出物及びその分画物の TLC を示した．50% sulfuric acid により ethanol 抽出物において複数の明瞭なバンドが検出され，それらの多くが有機層の疎水性画分に分配された．また，細分画された画分のうち，methanol 溶出画分においてはリン脂質検出試薬の Dittmer-Lester 試薬に発色するバンドが複数認められ, 糖脂質に発色する DPA 試薬では検出されなかった．他方，acetone 溶出画分においては，DPA 試薬に発色するバンドが複数認められ，一部 Dittmer-Lester 試薬でも発色した．chloroform 溶出

画分においてはカロテノイド並びにクロロフィルが検出されたが，それ以外は 50% sulfuric acid で検出される 1 バンドのみであった．

methanol 溶出物において明瞭に検出された 5 バンドのうち，Rf 値 0.59, 0.50, 0.24 及び 0.10 のバンドは標準リン脂質の Rf 値との対比からそれぞれ phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine 及び lysophosphatidylcholine であると推察された（標準リン脂質の Rf 値：PO-PG, 0.60; PO-PE, 0.51; PO-PA, 0.47; PO-PS, 0.42; PO-PC, 0.22; P-LPC, 0.10). 他方，Rf 値 0.38 のバンドについてはどの標準品の Rf 値とも合致しなかった．

3.5 Phospholipase 処理物の NO/サイトカイン産生抑制活性

マクロファージの LPS 誘導型 NO/サイトカイン産生に対するリン脂質画分の抑制活性に及ぼす phospholipase の影響を図 3 に示した．リン脂質画分の NO 産生阻害は phospholipase A1 及び phospholipase A2 処理により有意に失われた（図３A）．他方，phospholipase C により産生阻害は低下傾向を示したが, 酵素未処理区に比して有意ではなかった. また，図３B に示すように，リン脂質画分の TNF-α産生阻害は酵素処理により低下し，特に phospholipase A1（濃度：1 μg/mL）及び phospholipase A2（濃度：10 μg/mL）で有意な低下を示した．

４．考察

我々は，in vitro 炎症モデルとして多用されているマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用い，大腸菌由来 LPS により誘導される NO/TNF-α の産生に及ぼすスサビノリ抽出物の影響を検証した．その結果, 藻体から ethanol, methanol あるいは chloroform で抽出される成分が，強い NO/TNF-α産生抑制作用を有することを明らかにした．これらの有機溶媒は共通して脂質の抽出に用いられることが多いことから，NO/TNF-α産生抑制に関与する成分も脂質であることが推察された．そこで，高活性を有する ethanol 抽出物を液液分配により親水性画分と疎水性画分に分け，脂質の存在が予想される疎水性画分については，色素ならびに単純脂質，糖脂質及びリン脂質の 3 画分に分画する Rouser の手法[25]に準じて分画した．TLC の結果は，疎水性画分が，(1) カロテノイドやクロロフィル等の色素，(2) 糖脂質及び (3) リン脂質で構成されることを示すものであった．また，NO/TNF-α産生抑制作用は糖脂質画分及びリン脂質画分に認められ，色素画分には認められなかった．NO/TNF-α産生抑制作用が特に強かったリン脂質画分を phospholipase で処理したところその抑制活性が減失し，その低減作用は phospholipase A1 及び phospholipase A2 で特に強いものであった．これらの結果から，スサビノリ由来の脂質画分には LPS によるマクロファージの NO/TNF-α産生を抑制する物質が存在し，少なくとも，リン脂質類がその作用に寄与している可能性が高いことを示唆している．また，リン脂質を多く含まない糖脂質画分にもリン脂質画分と同程度の抑制活性が認められることから，スサビノリ脂質の NO/TNF-α産生抑制作用は 1 種類の成分（群）によってのみ引き起こされるものではないことを示している．

日本食品標準成分表 2010[30]によれば，スサビノリの脂質含量は乾物あたり 3.7%で，これは，ワカメ（1.6%），マコンブ（1.2%），アオノリ（0.3%），イワノリ等の他の海藻類に比べれば格段に高い数値である．また，スサビノリの脂質クラスについて詳細に調べた Araki らの研究[31),32)]によれば，スサビノリ脂質は主として monogalactosyl diacylglycerol (MGDG; 27.2molar%), digalactosyl diacylglycerol (DGDG; 24.5molar%), sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG; 10.6molar%) などのガラクト糖脂質及び phosphatidylglycerol (19.0molar%), phosphatidylcholine (12.2molar%), phosphatidylethanolamine (3.2molar%)などのグリセロリン脂質から成り，triacylglycerol などの単純脂質は 3.4molar%と少ないのが特徴である．さらに，スサビノリ脂質の脂肪酸組成を見ると，palmitic acid 並びに炭素数 20 の不飽和脂肪酸がほとんどを占め，中でも魚油に多く含まれる eicosapentaenoic acid が総脂肪酸の 50%以上を占める[29]大変ユニークなものである．他方，本研究において TLC により存在が推定された methanol 溶出物のリン脂質クラスは phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine 及び lysophosphatidylcholine であり，これは，Araki らが先に示したリン脂質組成に概ね合致するものである．

以上の結果から，リン脂質及び糖脂質で構成されるスサビノリ由来の複合脂質は，LPS 刺激により惹起されるマクロファージの NO/サイトカイン産生を抑制する作用を有することが強く示唆される. また，NO/サイトカイン産生抑制における活性因子の候補としてリン脂質が挙げられるが，脂肪酸組成との関係，分子構造依存性，リン脂質クラスによる活性の違いなどについて不明な点を多く残しており，今後の詳細な検討が必要であろう．

Jiang らは, スサビノリから抽出したポルフィランにおける RAW264.7 細胞の LPS 誘導型 NO/TNF-α産生に及ぼす影響を調べ，ポルフィランが NO の産生を抑えることを明らかにしている [33]．本研究は，Jiang らの研究に続き，スサビノリ由来の成分が抗炎症作用を有することを示す有意義な結果である．スサビノリのこれまでの豊富な食経験を考慮すれば，本研究の結果やこれまで研究成果に基づき，安全な抗炎症食品を提供できる可能性が高いと考えられる．しかしながら，実際に食したときに抗炎症作用が発現するかどうかは明確にされておらず，その有効性について慎重に検討していく必要がある．スサビノリ脂質の体内吸収性や動態，抗炎症作用の作用メカニズム, 実験動物を用いた in vivo での作用の明示などが今後の検討課題といえる．

５．おわりに

本研究では，機能性食品原料としてのスサビノリの用途開発を志向して，スサビノリ由来低分子成分の抗炎症作用について検証した．その結果，

1) スサビノリ由来複合脂質画分は，マウス由来 RAW264.7 細胞における LPS 誘導型活性化を抑え，特にリン脂質画分は，iNOS, COX-2 ならびに TNF-αの発現誘導を抑制した．
2) スサビノリ由来複合脂質画分はリン脂質と糖脂質で構成され，そのうちリン脂質画分には phosphatidylglycerol， phosphatidylethanolamine， phosphatidylcholine が含まれることが示唆された．
3) スサビノリ由来リン脂質画分の NO/サイトカイン産生抑制作用は phospholipase 処理により減失したことから，抗炎症作用の関与成分として，リン脂質が提起された．

６．参考文献

1) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA and Bazan JF, A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95(2), 588–593 (1998).
2) Michalek SM, Moore RN, McGhee JR, Rosenstreich DL and Mergenhagen SE., The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. *J. Infect Dis.*, 141, 55-63 (1980).
3) Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K and Akira S., Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide - inducible genes. *J. Immunol.*, 167(10), 5887-5894 (2001).
4) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K and Akira S., TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 4(11), 1144-1150 (2003).
5) Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O and Akira S, Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 6(11), 1087-95 (2005).
6) 大柳善彦, NO と医学-一酸化窒素の生理作用と薬理作用, 共立出版, 156-184 (1993).
7) Tilg H and Diehl AM, Mechanisms of disease: cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 343,1467-1476 (2000).
8) Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P, Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.*, 10(1) , 45–65 (2003).
9) Chen G and Goeddel DV, TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296 (5573), 1634–1635 (2002).
10)Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D and Kollias G, Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO J.*, 10 (13), 4025–4031 (1991).
11)Wellen KE and Hotamisligil GS, Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin. Invest.* , 112:1785-88 (2003).
12)小川佳宏, 眞鍋一郎, 大島正伸, 竹田潔編, 慢性炎症-多様な疾患の基礎病態, 実験医学増刊. 羊土社 (2011).
13)Erridge C, Endogenious ligands of TLR2 and TLR4: agonists or antagonists? *J. Leuko. Biol.*, 87, 989-999 (2010).
14)農林水産省: 農林水産統計データ海面漁業生産統計調査, 平成 24 年漁業・養殖業生産統計.
15)Peat S, Turvey JR and Rees DA, Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicalis*. *J. Chem. Soc.*, 1590-1595 (1961).
16)Yoshizawa Y, Ametani A, Tsunehiro J, Nomura K,

Itoh M, Fukui F and Kaminogawa S, Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1933-1937 (1995).

17)Tsuge K, Okabe M, Yoshimura T, Sumi T,Tachibana H and Yamada K, Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of *Sprague-Dawley* rats. *Food Sci. Technol. Res.*, 10, 147-151 (2004).

18)Ishihara K, Oyamada C, Matsushima R, Murata M and Muraoka T, Inhibitory effect of porphyran, prepared from dried "Nori", on contact hypersensitivity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 1824-1830 (2005).

19)大石圭一編, シリーズ食品の科学　海藻の科学. 朝倉書店 (1993).

20)Muraoka T, Ishihara K, Oyamada C, Kunitake H, Hirayama I and Kimura T, Fermentation properties of low-quality red alga Susabinori *Porphyra yezoensis* by intestinal bacteria. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 72(7), 1731-1739 (2008).

21)Yoshiki, M, Tsuge, K, Tsuruta, Y, Yoshimura, T, Koganemaru, K, Sumi, T, Matsui, T and Matsumoto, K, Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, porphyra-334 by heat treatment. *Food Chem.*, 113(4), 1127-1132 (2009).

22)柘植圭介, 東江栄, 早川啓亮, 有明海干潟に自生する塩生植物の高機能性成分に関する研究. 平成 21 年度佐賀県工業技術センター報告, 21-25 (2010).

23)Ding AH, Nathan CF and Stuehr DJ, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, 141, 2407–2412 (1988).

24)Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K and Watanabe M, A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay, *Anal. Commun.*, 36, 47-50 (1999).

25)宮沢陽夫, 藤野泰郎編, 生物化学実験法 9　脂質・酸化脂質分析法入門 (改訂版). 学会出版センター, 75-76 (2000). .

26)Leray C and Pelletier X, Thin-layer chromatography of human platelet phospholipids with fatty acid analysis. *J. Chromatgr. B*, 420, 411-416 (1987).

27)Ryu EK and MacCoss M, Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospho-lipid derivatives on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.*, 20, 561-563 (1979).

28)Harris G and MacWilliam IC, Dipping technique for revealing sugars on paper chromatograms. *Chemistry and Industry*, 249 (1954).

29)Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L and Yin Z, Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-κB and JNK/AP-1 activation. *International Immunopharmacology*, 9(9), 1042-1048 (2009).

30)文部科学省科学技術・学術審査会資源調査分科会報告・日本食品標準成分表2010 http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/houkoku/1298713.htm

31)Araki S, Sakurai T, Omata T, Kawaguchi A and Murata N, Lipid and fatty acid composition in the red alga *Porphyra yezoensis*. *Jpn. J. Phycol.*, 34, 94-100 (1986).

32) Araki S, Sakurai T, Omata T, Kawaguchi A and Murata N, Positional distribution of fatty acids in glycero-lipids of the marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *Plant Cell Physiol.*, 28(5), 761-766 (1987).

33)Jiang Z, Hama Y, Yamaguchi K and Oda T, Inhibitory effect of sulphated polysaccharide porphyran on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Biochem.*, 151(1), 65-74 (2012).