

海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用（第 2 報）

-スサビノリにおける抗炎症性脂質の特定-

食品工業部

柘植圭介 鶴田裕美 佐藤真佐恵

吉村臣史

本研究では、機能性素材としてのスサビノリの用途開発を志向して、抗炎症作用を有するスサビノリ由来リン脂質の特定化を試みた。マウス由来 RAW264.7 細胞を大腸菌由来 LPS で刺激して NO 及びサイトカイン産生を誘導させ、クロマトグラフィーにより分離精製したリン脂質の共存による産生抑制作用（抗炎症作用）を評価した。その結果、質量分析装置（MS）により m/z 783.4 で検出されるリン脂質に、強い NO 及びサイトカインの産生抑制が認められた。脂肪酸組成分析ならびに phospholipase A2 消化物の質量分析により、このリン脂質が、*sn*-1 位に eicosapentaenoic acid が、*sn*-2 位に 3-hydroxypalmitic acid がそれぞれエステル結合した 1-eicosapentaenoyl-2-(3-hydroxypalmitoyl)-phosphatidylglycerol (EpPOH-PG) であることを明らかにした。構造の異なる種々のリン脂質の抗炎症作用を比較し、構造/機能相関を検証した。リン脂質クラスの中では、phosphatidylglycerol に強い抗炎症作用を認め、不飽和脂肪酸が結合したリン脂質の方が、より作用が強い傾向であった。また、比較したリン脂質のうち、EpPOH-PG が最も抗炎症作用が強かった。以上の結果は、スサビノリ由来 EpPOH-PG が、抗炎症性リン脂質としての構造的特徴を備えており、炎症の防止に役立つ機能性素材としての可能性を明示するものである。

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。そ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はたらく。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、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¹⁻³⁾が知られている。

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⁴⁾。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 Toll 様受容体（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⁵⁾、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、アジア地域において長い食の歴史を有し、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⁶⁾。

これまで、スサビノリを構成する成分の摂取による様々な生理作用が報告されている。我々はこれまでに、スサビノリ由来複合脂質に、LPS 刺激によるマクロファージの活性化を抑える作用（抗炎症作用）があることを明らかにした⁷⁾。スサビノリ由来複合脂質は、マウス由来 RAW264.7 細胞における LPS 誘導型活性化を抑え、iNOS、COX-2 ならびに TNF- α の発現誘導を抑制する。また、この画分は主として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 (PG)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylcholine (PC) が含まれることが示唆されている。Araki らの研究^{8),9)}によれば、スサビノリ脂質の脂肪酸組成は、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 (EPA) が総脂肪酸の 50%以上を占める¹⁰⁾大変ユニークなものである。しかしながら、スサビノリ複合脂質由来の抗炎症作用性脂質の特定化や、その構造決定についてはいまだ進展が見られない。

このような背景から、本研究では、スサビノリ由来複合脂質画分に含まれる抗炎症性脂質の特定化を志向し、複合脂質の分画・精製と抗炎症作用の評価を実施した。これまでの研究で、特に抗炎症作用が強いことが明らかとなっているリン脂質画分を起点とし、固相抽出やクロマトグラフィーを用いてリン脂質をクラスごと、分子種ごとに精製した。精製したもののうち、最も抗炎症作用が強いリン脂質の分子構造を推定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 2011 年度有明海産板海苔を用いた。試料を超遠心粉碎機 (ZM-1; Retsch 製) で粉碎し、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), mouse TNF-α/IL-6 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), 1,2-dipalmitoyl-phosphatidylglycerol (diP-PG), 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-phosphatidylglycerol (PA-PG), 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 8 点総て Avanti Polar Lipid), 1,2-dieicosapentaenoyl phosphatidylcholine, methyl palmitoleate, methyl palmitate, methyl stearate, methyl oleate, methyl linoleate, methyl eicosapentaenoate, methyl arachidonate (以上 8 点総て Sigma-Aldrich), methyl 3-hydroxypalmitate (Matreya LLC), quantitative GC mixture, GLC-60 (containing 4 C20-series fatty acid

methyl esters, eicosanoate, cis-11- eicosenoate, cis-11,14-eicosadienoate, and cis-11,14,17-eicosatrienoate; Matreya LLC), phospholipase A2 (*Naja mossaibica mossaibica* 由来; Sigma-Aldrich), TMS-HT (HMDS/TMCS/pyridine=3/1/9 (v/v/v); 東京化成工業)。

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、HPLC 用試薬もしくは LC-MS 用試薬を用いた。

2.2 細胞培養試験

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%CO₂ 存在下 37℃で継代培養した。LPS 誘導型 NO 及び TNF-α/IL-6 の産生試験は、既報⁷⁾に従った。試料は溶媒を完全に留去した後、培地に懸濁させ、超音波処理により分散させた。TNF-α濃度及び IL-6 濃度は市販キットを用いた sandwich ELISA により求めた。NO 産生量は、Griess 法¹¹⁾により培養上清に蓄積した亜硝酸イオン(NO₂)濃度を測定することにより算出した。これらの炎症性物質の産生阻害率は、式 (1) により算出した。

$$\text{産生阻害率 (\%)} = \{1 - (\Delta A_a - \Delta A_b) / (\Delta A_c - \Delta A_b)\} \times 100 \cdots (1)$$

ここで、

ΔA_a : 試料添加培地の吸光度差

ΔA_b : ブランクの吸光度差

ΔA_c : コントロールの吸光度差。

必要に応じ、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を、Dunnett の多重比較により検定した。

2.3 細胞傷害性

細胞試験による炎症性メディエーター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) を用いて、試料の細胞障害性を測定した。2.2 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。

2.4 脂質の抽出及び分画

Chloroform/methanol 混合溶媒 (C/M=1/1,v/v) を用いて、スサビノリ粉末より脂質を抽出した。1 kg の

スサビノリ粉末に 8 L の溶媒を添加し、常温にて 1 時間攪拌した。これを減圧濾過により固液分離し、抽出液を回収した。抽出残渣に再度 5 L の溶媒を加え、常温にて 1 時間攪拌した。減圧濾過により抽出液を得、第一の抽出液と合わせてこれを減圧濃縮し、約 1.5 L のスサビノリ脂質濃縮液を得た。これに chloroform/methanol/0.9% KCl 水溶液=1/1/0.9 (v/v/v) になるよう各溶媒を添加し、振盪後、4°C にて一晩静置して 2 層分離させた。上層を慎重に除去し、下層を減圧濃縮して溶媒を留去し、49.1 g のスサビノリ由来脂質を得た。

抽出した脂質は色素や単純脂質を含むため、シリカゲルカラムを用いた固相抽出法¹²⁾により複合脂質を分画した。Chloroform で平衡化したシリカゲルカラム (ゲル容量 240 mL, ガラス製クロマト管 (i.d. 60 x length 500 mm) にパッキング) に、chloroform に溶解した脂質 5 g をアプライした。カラム容量の 7 倍量の chloroform を添加し、chloroform 溶出画分を得た。次に、カラム容量の 7 倍量の acetone をアプライし、acetone 溶出画分を得た。最後に、カラム容量の 5 倍量の methanol をアプライし、methanol 溶出画分を得た。

リン脂質を多く含む methanol 溶出画分⁷⁾を、acetone/methanol (A/M) 混合溶媒を用いた固相抽出法によりさらに分画した。Chloroform に溶解した methanol 溶出画分を、acetone で平衡化したシリカゲルカラム (容量: 21.7 mL) にアプライし、acetone, A/M = 9/1, A/M = 8/2, A/M = 7/3, 及び methanol で順次溶出させ (125 mL ずつ)、各々の画分の溶媒を留去して細胞試験に供した。

2.5 抗炎症脂質の精製

細胞試験の結果、抗炎症作用が最も強かった A/M = 8/2 溶出画分を、Diol カラムを用いた順相高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) によりさらに分画した。クロマトグラフィーの条件は下記のとおりである：

装置、日本分析工業製 NEXT; カラム、Develosil 100 Diol-5 (i.d. 8 x length 250 mm, 野村化学); 移動相, hexane/2-propanol/acetic acid/1 mmol/L ammonium acetate = 68/20/0.07/3 (v/v/v/v); 流速, 3 mL/min; 検出, UV at 214 nm; 注入量, 7.5 mg/150 μ L; 分画スケジュール, 注入 3 分後より 1 分間隔で 9 本分取, その後 12~49.5 分まで 1.5 mL 間隔で 24 本分取。

クロマトグラムならびに各フラクションの TLC (データは示さず) によるバンド位置より、フラクション A から H までの 8 つの画分にまとめた。各フ

ラクションは、溶媒を留去後に 2 mL の C/M=1/1 に再溶解させ、次項に示す手法により脂肪酸含量を測定した。脂肪酸含量より各フラクションのモル濃度を推算し、終濃度 10, 20 μ mol/L で RAW264.7 細胞に添加して細胞試験を行った。

2.6 脂質の定性・定量

薄層クロマトグラフィー (TLC) により脂質の分画状態を確認した。展開条件は以下の通りである：プレート, Silica gel-60 TLC aluminum plates (Merck Germany); 試料塗布量, 150 μ g; 展開溶媒, chloroform/methanol/water/triethylamine = 30/35/7/35 (v/v/v/v); 発色, Dittmer-Lester 試薬。

分画物の脂質含量は、脂肪酸含量をガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS) により定量することで推算した。試料は、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム-methanol 処理に続く BF₃-methanol 溶液処理でメチルエステル化した後、シリル化剤 (TMS-HT) で TMS 化して GC-MS に導入した。GC-MS の条件は下記のとおりである：

装置、島津株式会社製 GC2010 + QP2010; カラム, Sigma-Aldrich Co 製 SP2380 (length 100 m x i.d. 0.25 mm x film thickness 0.2 μ m); キャリアガス流速, 20 cm/sec (helium); カラム温度, 140°C for 5 min, 140-205°C at 1.5°C/min, 205-240°C at 10°C/min, 240°C for 8 min; 注入, 1 μ L; スプリット比 20:1 at 250°C; 検出, EI-MS。

2.7 構造解析

NP-HPLC による分画物のうち、抗炎症作用が最も強い画分を C/M=1/1 に再溶解させ、さらに methanol で 10 倍希釈して濃度 100 μ g/mL とし、エレクトロスプレーイオン化-イオントラップ型質量分析計 (ESI-ITMS) に導入した。

また、グリセロール骨格の 2 位にエステル結合する脂肪酸を特異的に加水分解する酵素 phospholipase A2 (PLA2) を用いて、構成脂肪酸の結合位置を特定した。分画物 50 μ g を diethylether/methanol = 98/2 (v/v) 1 mL に溶解させ、*Naja mossambica mossambica* 由来 PLA2 を 200 mU 添加し、常温で 3 時間攪拌した。反応液を遠心分離 (1,000 x g, 10 min) して有機溶媒層を回収し、遠心濃縮により溶媒を留去した。乾固物に methanol 0.2 mL を添加し、ESI-ITMS に供した。ESI-ITMS の条件は下記のとおりである：

装置, Bruker Daltonics 製 HCT Ultra; イオン源, ESI; ポラリティ, 負イオン; 流量, 3 μ L/min; イオン源温度, 300°C; ネブライザーガス圧力, 10 psi; ネブライザーガス流量, 5 L/min; キャピラリー電位, 4 kV; end

plate offset, 0.5 kV; スキャン範囲, 50-1500 *m/z*; スキ
ャンスピード, 毎秒 8100 *m/z*.

3. 結果

3.1 分画物の活性比較

スサビノリ由来リン脂質を A/M 混合溶媒を用い

た SPE により A, A/M = 9/1, A/M = 8/2, A/M = 7/3, 及
び M 溶出画分に 5 分画した. 各画分の収率を表 1
に, 活性化マクロファージの炎症性メディエーター
産生に及ぼす影響を表 2, 3 及び 4 に示す. 収率が最
も高かったのは AM = 8/2 溶出画分であった. また,
各添加濃度における NO 産生阻害, TNF- α 産生阻害,

表 1 スサビノリ由来リン脂質のSPEにおける収率

	Yield 1	Yield 2	Yield 3	Lipid class, identified
	wt%			
Powder	100.0			
Crude lipid	4.9	100.0		
1st SPE				
Methanol eluent	1.4	27.8	100.0	PLs, GLs
2nd SPE				
Acetone	0.24	4.9	17.7	GLs
A/M=9/1	0.22	4.4	15.8	GLs, PG
A/M=8/2	0.42	8.5	30.6	PG, PE
A/M=7/3	0.12	2.4	8.5	PE
Methanol	0.22	4.4	16.0	PC, LPC

Yield 1, ノリ粉末を100としたときの収率; Yield 2, 粗脂質を100としたときの収率; Yield 3, メタノール溶
出画分を100としたときの収率; PL, リン脂質; GL, 糖脂質; PG, phosphatidylglycerol; PE,
phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine

表 2 スサビノリ由来リン脂質のSPE画分における抗炎症作用 (NO産生阻害) の比較

試料濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	NO産生阻害率 (%)				
	Acetone	AM=9/1	A/M=8/2	A/M=7/3	Methanol
10.0	67.4 \pm 2.5	69.7 \pm 5.4	89.0 \pm 0.2	59.4 \pm 4.0	11.6 \pm 3.9
1.0	21.8 \pm 5.8	34.6 \pm 1.3	33.5 \pm 3.8	2.8 \pm 2.8	-11.8 \pm 24.0
0.1	12.8 \pm 7.0	7.8 \pm 6.1	16.3 \pm 4.3	-13.1 \pm 5.5	-11.6 \pm 13.4

表 3 スサビノリ由来リン脂質のSPE画分における抗炎症作用 (TNF- α 産生阻害) の比較

試料濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	TNF- α 産生阻害率 (%)				
	Acetone	AM=9/1	A/M=8/2	A/M=7/3	Methanol
10.0	22.2 \pm 1.8	27.1 \pm 4.1	35.8 \pm 6.2	18.1 \pm 4.0	8.4 \pm 4.7
1.0	5.1 \pm 3.2	15.9 \pm 8.9	17.0 \pm 9.7	0.5 \pm 6.0	18.4 \pm 10.1
0.1	-13.9 \pm 6.8	-2.4 \pm 2.4	0.2 \pm 4.3	7.6 \pm 2.3	-2.2 \pm 5.8

表 4 スサビノリ由来リン脂質のSPE画分における抗炎症作用 (IL-6産生阻害) の比較

試料濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	IL-6産生阻害率 (%)				
	Acetone	AM=9/1	A/M=8/2	A/M=7/3	Methanol
10.0	77.5 \pm 2.2	80.4 \pm 3.3	94.9 \pm 1.9	50.7 \pm 4.8	43.0 \pm 6.8
1.0	38.5 \pm 8.8	38.1 \pm 6.5	48.5 \pm 10.2	-4.3 \pm 12.2	28.6 \pm 10.6
0.1	10.4 \pm 10.1	-2.5 \pm 14.7	16.1 \pm 10.8	-0.6 \pm 4.3	-1.2 \pm 8.3

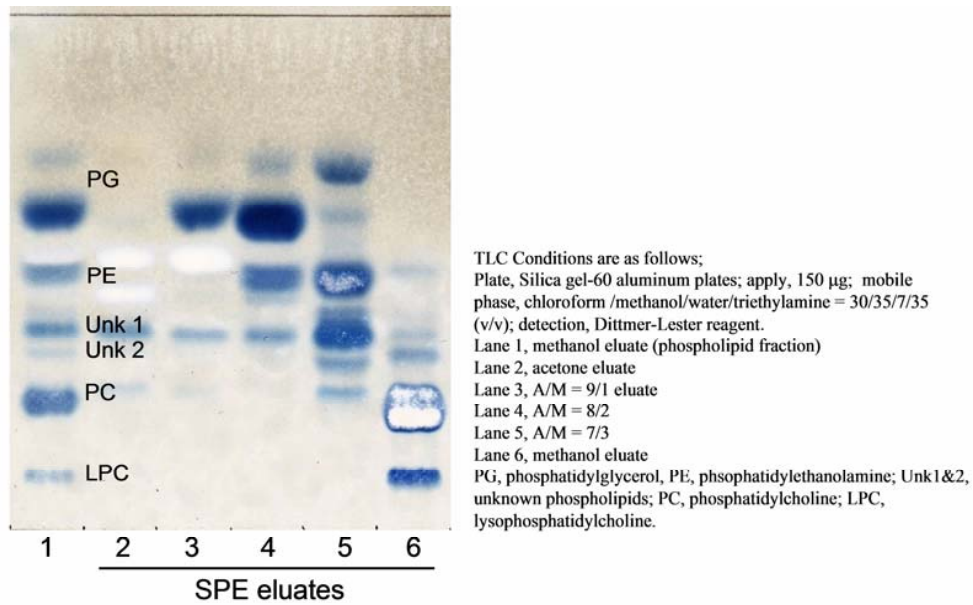


図1 スサビノリ由来リン脂質のSPE画分における薄層クロマトグラム

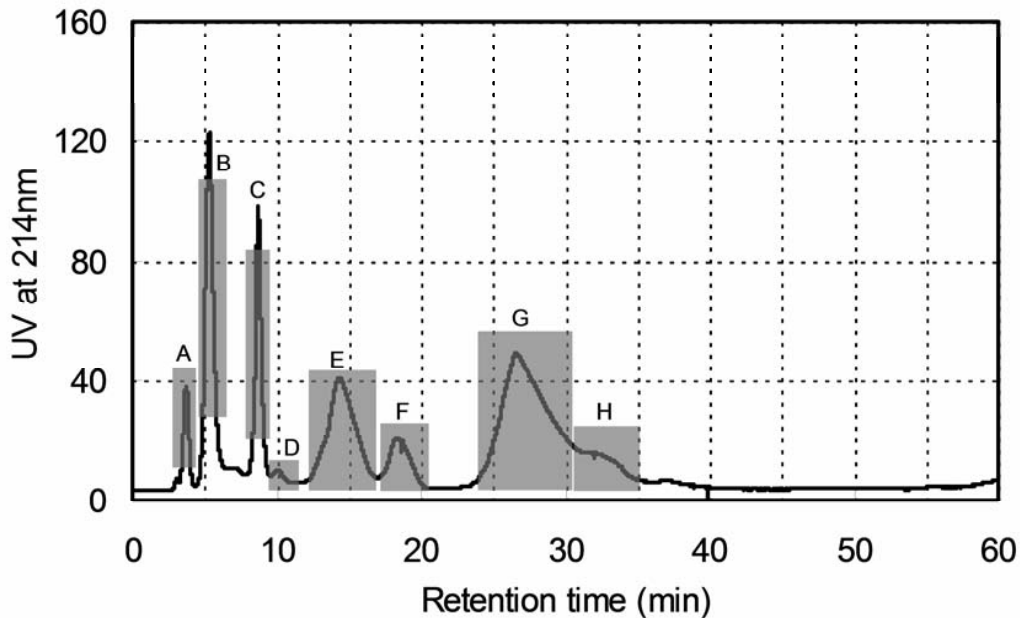


図2 スサビノリ由来リン脂質由来A/M = 8/2画分の高速液体クロマトグラフィーによる細分画

HPLC Condition are as follows;
 Column, Develosil 100 Diol-5 (i.d. 8 x length 250 mm, Nomura Chemicals); mobile phase, hexane/2-propanol/
 acetic acid/1 mmol/L ammonium acetate = 68/20/0.07/3 (v/v/v/v); flow rate, 3 mL/min; detection, UV at 214
 nm; injection volume, 7.5 mg/150 µL.
 Fraction A-H (highlighted on chromatogram) were collected and provided into in vitro assay.

IL-6 産生阻害いずれにおいても、最も高い阻害率を示したのは、A/M = 8/2 溶出画分であった。TLC の結果、A/M = 8/2 溶出画分において検出される主要なバンドの Rf 値は、phosphatidylglycerol (PG) とほぼ同一であり、この画分が PG を主成分として含むリン

脂質であることを強く示唆していた (図 1)。なお、試験した全ての区において、Cell Counting Kit-8 による細胞傷害性は認められなかった。

次に、A/M = 8/2 溶出画分を Diol カラムによる順相クロマトグラフィーにより細分画し、8 つの画分

(フラクシオン A~H) を得た (図 2)。フラクシオン A については、GC-MS による脂肪酸組成解析によりほとんど脂質が含まれていないことが判明したため、以後の評価から除外した。フラクシオン B~H の NO, TNF- α , IL-6 産生抑制作用を図 3 に示した。各画分の抗炎症作用を比較した結果、フラクシオン E 及び F に強い NO 産生抑制作用が認められ、なか

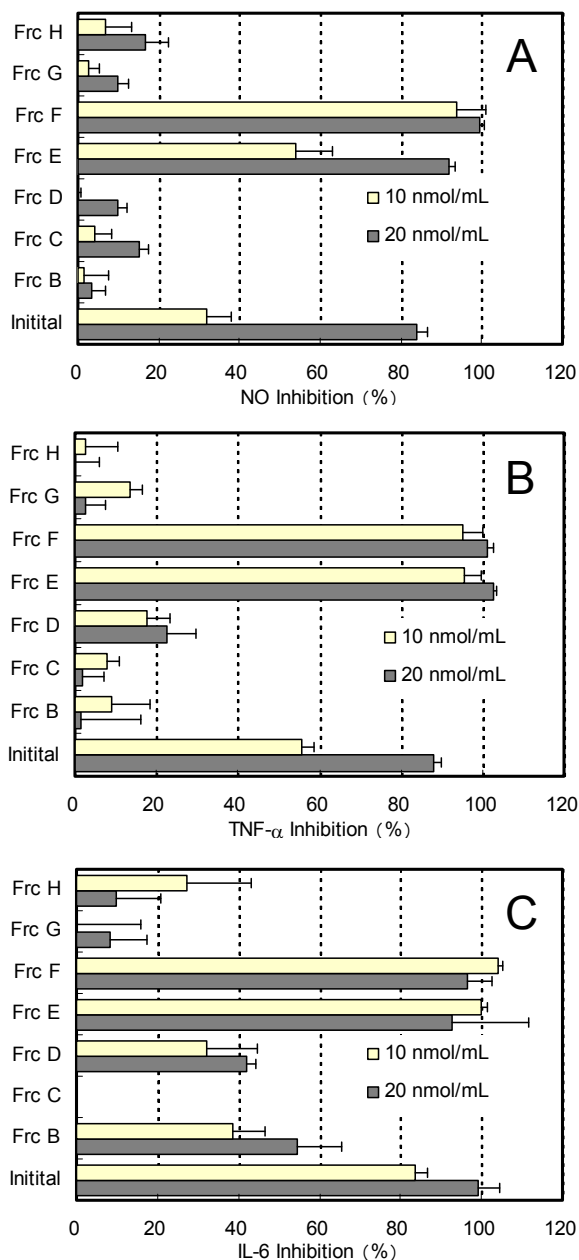


図 3 マクロファージのLPS誘導型NO及び炎症性サイトカイン産生に及ぼすスサビノリ由来リン脂質分画物の影響

A, NO; B, TNF- α ; C, IL-6

でもフラクシオン F が最も作用が強かった。また、フラクシオン E 及び F は TNF- α , IL-6 の産生抑制作用も強く、スサビノリ由来リン脂質に含まれる抗炎症脂質の主体は、この画分に分配されているものと判断された。なお、試験した全ての区において、Cell Counting Kit-8 による細胞傷害性は認められなかった。

3.2 抗炎症脂質の構造解析

フラクシオン F を C/M =1/1 に再溶解させ、ESI-ITMS に導入した。その結果、図 4 に示すように、主要な脱プロトン分子 [M-H] である m/z 783.4 ならびにそれらの同位体ピークが検出された。また、 m/z 783.4 をプレカーサーとする MS/MS により検出される主要なフラグメントは、 m/z 271.0 並びに m/z 529.1 であった。さらに、MS/MS フラグメント m/z 529.1 をプレカーサーとする MS³ により検出される主要なフラグメントは m/z 257.0 並びに m/z 301.0 であった。

他方、表 5 の脂肪酸組成に示すように、フラクシオン F は、ほぼ当モル比の EPA と 3-hydroxypalmitic acid (3-OH-PA) で構成されていた。

フラクシオン F の PLA2 消化物の MS を図 5 に示す。主要な脱プロトン分子 [M-H] として、 m/z 271.0 ならびに m/z 529.1 が観察された。

以上の結果より、フラクシオン F は、EPA と 3-OH-PA を構成脂肪酸とし、*sn*-2 位に質量 272.0 の脂肪酸が結合する、モノアイソトピック質量 784.4 のリン脂質であると判断される。3-OH-PA のモノアイソトピック質量が 272.2 であることから、このリン脂質の *sn*-2 位に結合するのは 3-OH-PA である。

表 5 フラクシオン E 及びフラクシオン F における脂肪酸組成

	脂肪酸組成 (mol%)	
	フラクシオン E	フラクシオン F
Palmitate (C16:0)	29.2	1.6
<i>trans</i> -13-Hexadecanoate (C16:1n13t)	19.4	1.1
3-OH-Palmitate (3-OH-C16:0)	N.D.	47.1
Stearate (C18:0)	Tr.	N.D.
Oleate (C18:1n9c)	2.6	0.4
Linoleate (C18:2n6c)	Tr.	N.D.
Arachidate (C20:0)	N.D.	N.D.
<i>cis</i> -11-Eicosenoate (C20:1n9c)	N.D.	N.D.
<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoate (C20:2n6c)	0.1	N.D.
<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoate (C20:3n6c)	N.D.	N.D.
Arachidonate (C20:4n6c)	0.1	N.D.
EPA (C20:5n3c)	48.5	49.8
Total	100.0	100.0

また、EPA と 3-hydroxypalmitic acid (3-OH-PA)で構成される PG のモノアイソトピック質量が、理論上 784.4 であり、本研究における TLC 並びに MS の測定結果と合致する。

以上の測定結果より、このリン脂質は、*sn*-1 位に

EPA が、*sn*-2 位に 3-OH-PA がエステル結合する PG である 1-eicosapentaenoyl-2- (3-hydroxypalmitoyl)-phosphatidylglycerol (EpPOH-PG; 図 6) と推定された。MS/MS および MS³ における測定結果も、このリン脂質が EpPOH-PG であることと矛盾しない結果であ

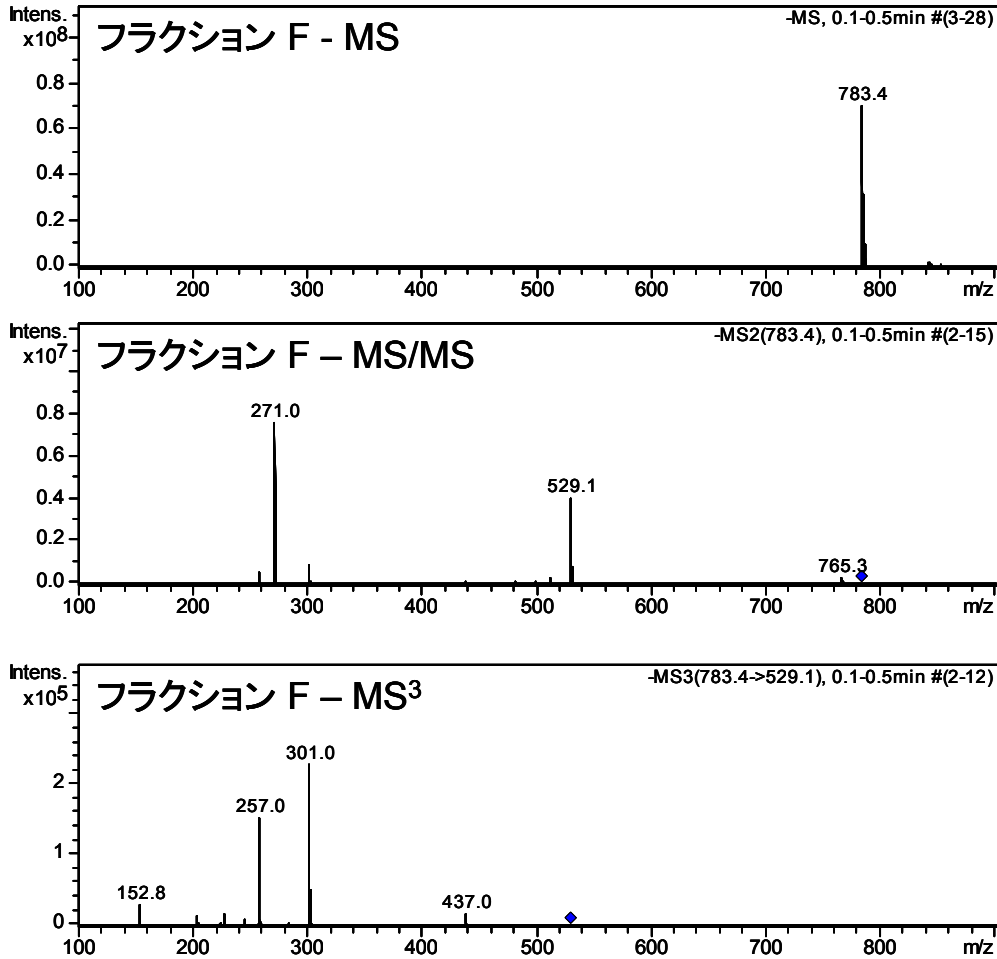


図 4 フラクションFのESI-ITMSによる質量分析およびフラグメント解析

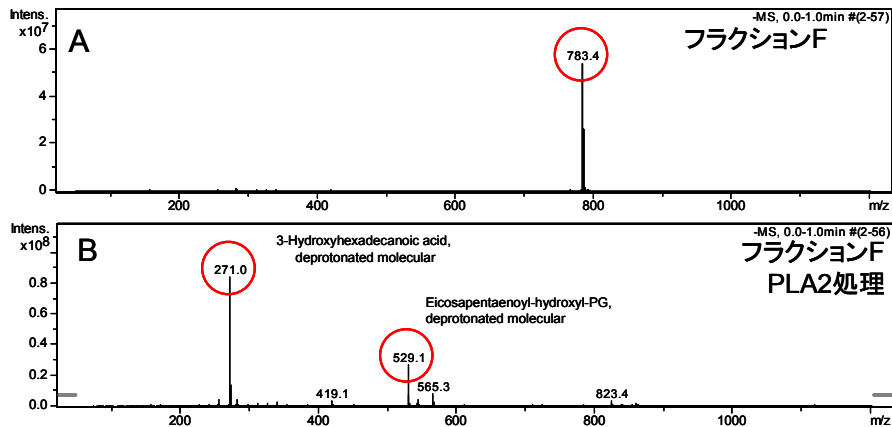


図 5 フラクションF及びPLA2消化物のESI-ITMSによる質量分析

る。

3.3 リン脂質における抗炎症作用の比較

EpPOH-PG を含む種々のリン脂質における活性化マクロファージの NO 産生抑制作用を比較した (表 6)。評価したリン脂質のうち、明確な NO 産生抑制が認められたのは、1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (PO-PG) , 1-palmitoyl-2-

arachidonoyl phosphatidylglycerol (PA-PG) , 1,2-dieicosapentaenoyl phosphatidylcholine (diEp-PC)及びEpPOH-PG であり、特に、EpPOH-PG 及び PA-PG に強い抑制作用が見られた。また、炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を見たところ、表 7 に示すように、NO 産生に及ぼす影響と同様、PO-PG, PA-PG, diEp-PC 及び EpPOH-PG に明確な産生抑制作用を認

表 6 マクロファージのLPS誘導型NO産生に及ぼす種々のリン脂質の影響

	PO-PG	diP-PG	PA-PG	EpPOH-PG	PO-PA
fatty acids					
<i>sn-1</i>	palmitic acid	palmitic acid	palmitic acid	eicosapentaenoic acid	palmitic acid
<i>sn-2</i>	oleic acid	palmitic acid	arachidonic acid	3-hydroxyhexadecanoic acid	oleic acid
<i>sn-3</i>	phosphoglycerol	phosphoglycerol	phosphoglycerol	phosphoglycerol	phosphoric acid
% NO production inhibition					
30 nmol/mL	59 ± 4	-14 ± 9	95 ± 3	100 ± 2	-10 ± 7
10 nmol/mL	14 ± 5	-4 ± 11	43 ± 5	90 ± 3	-8 ± 9
3 nmol/mL	1 ± 5	2 ± 5	17 ± 10	30 ± 6	-5 ± 8
	PO-PC	diEp-PC	PO-PS	POPE	P-LPC
fatty acids					
<i>sn-1</i>	palmitic acid	eicosapentaenoic acid	palmitic acid	palmitic acid	palmitic acid
<i>sn-2</i>	oleic acid	eicosapentaenoic acid	oleic acid	oleic acid	-
<i>sn-3</i>	phosphocholine	phosphocholine	phosphoserine	phosphoethanolamine	phosphocholine
% NO production inhibition					
30 nmol/mL	-10 ± 8	62 ± 4	-9 ± 9	-17 ± 10	-8 ± 13
10 nmol/mL	-4 ± 8	29 ± 4	-11 ± 8	-6 ± 8	-2 ± 10
3 nmol/mL	-1 ± 8	11 ± 4	-6 ± 13	-6 ± 8	0 ± 7

表 7 マクロファージのLPS誘導型炎症性サイトカイン産生に及ぼす種々のリン脂質の影響

	PO-PG	diP-PG	PA-PG	EpPOH-PG	PO-PA
% TNF-α production inhibition					
30 nmol/mL	81 ± 2	-26 ± 18	97 ± 2	105 ± 1	-1 ± 2
10 nmol/mL	54 ± 4	6 ± 16	52 ± 13	88 ± 6	-7 ± 18
3 nmol/mL	20 ± 2	11 ± 6	24 ± 21	58 ± 7	0 ± 7
% IL-6 production inhibition					
30 nmol/mL	99 ± 0	13 ± 4	94 ± 2	92 ± 3	2 ± 2
10 nmol/mL	87 ± 2	22 ± 4	84 ± 7	97 ± 2	-3 ± 2
3 nmol/mL	64 ± 3	7 ± 27	38 ± 5	81 ± 7	-2 ± 20
% WST Activity					
30 nmol/mL	103 ± 1	98 ± 1	104 ± 2	105 ± 2	89 ± 12
10 nmol/mL	102 ± 2	99 ± 4	103 ± 1	105 ± 2	90 ± 7
3 nmol/mL	98 ± 4	98 ± 4	104 ± 1	104 ± 2	99 ± 3
	PO-PC	diEp-PC	PO-PS	POPE	P-LPC
% TNF-α production inhibition					
30 nmol/mL	2 ± 6	48 ± 9	-5 ± 2	19 ± 12	-11 ± 14
10 nmol/mL	3 ± 13	26 ± 7	1 ± 11	11 ± 14	-5 ± 5
3 nmol/mL	-5 ± 1	8 ± 12	9 ± 9	1 ± 8	0 ± 8
% IL-6 production inhibition					
30 nmol/mL	4 ± 39	71 ± 5	-11 ± 12	25 ± 15	1 ± 15
10 nmol/mL	-6 ± 15	36 ± 1	-14 ± 29	18 ± 15	2 ± 9
3 nmol/mL	1 ± 12	-9 ± 36	13 ± 6	15 ± 7	17 ± 7
% WST Activity					
30 nmol/mL	97 ± 4	103 ± 1	95 ± 2	84 ± 8	104 ± 0
10 nmol/mL	96 ± 2	101 ± 0	88 ± 4	98 ± 2	102 ± 2
3 nmol/mL	98 ± 1	99 ± 1	88 ± 13	94 ± 3	99 ± 2

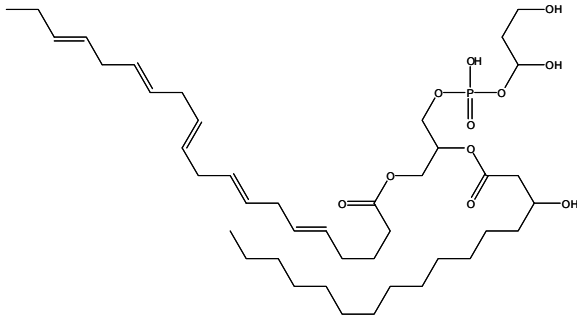


図6 新規抗炎症性リン脂質1-eicosapentaenoyl-2-(3-hydroxypalmitoyl)-phosphatidylglycerol (EpPOH-PG)の分子構造推定

め、特に EpPOH-PG でその作用が強かった。試験した全ての区において、Cell Counting Kit-8 による細胞傷害性 (WST 活性) は認められなかった。

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、スサビノリ由来抗炎症性リン脂質の特定化を試みた。抗炎症作用の指標として、LPS により誘導される 3 つの炎症性メディエータ (NO, TNF- α , IL-6) の産生抑制率で比較した。スサビノリ由来リン脂質から、SPE 及び HPLC により構造の異なる脂質を分画し、各々の抗炎症作用を比較した。その結果、EPA と 3-OH-PA とで構成される PG が、強い抗炎症作用を有することを見出した。PLA2 消化物の MS 観察結果より、この脂質の *sn*-2 位にエステル結合する脂肪酸は 3-hydroxypalmitic acid であることを特定した。以上の実験結果より、この抗炎症性リン脂質は、1-eicosapentaenoyl-2-(3-hydroxypalmitoyl)- phosphatidylglycerol (EpPOH-PG) であると推定した (図 6)。

EpPOH-PG を含むいくつかのリン脂質における抗炎症作用を比較したところ、脂質クラスの中でも、特に PG に強い作用が認められたが、その作用の程度は、結合する脂肪酸によって異なり、調査した範囲では、活性の強さは EpPOH-PG > PA-PG > PO-PG で、diP-PG には全く活性が見られなかった。また、phosphatidylcholine (PC) においては、PO-PC には全く作用が認められなかったが、EPA が 2 つ結合する diEp-PC には抗炎症作用が認められた。これらのことから、活性化したマクロファージに対するリン脂質の抗炎症作用の強さは、結合する脂肪酸 (尾部) とリン酸エステルを含む頭部の種類により異なることが示唆される。得られた実験結果から抗炎症作用

と分子構造の関係性を見る限り、尾部の脂肪酸の不飽和度が高いことと、頭部が phosphoglycerol であることの 2 点が、リン脂質における抗炎症作用の発現にとって重要であると考えられた。

肺胞サーファクタント由来リン脂質の抗炎症作用に関する Kuronuma らの研究¹³⁾によれば、PO-PG や phosphatidylinositol などの酸性リン脂質は、ヒトリンパ腫由来細胞株 U937 の TLR-4 を介したサイトカイン産生を抑えることが明らかとなっている。また、Kandasamy¹⁴⁾らは、*Mycoplasma pneumoniae* の刺激による TLR-2 を介した RAW264.7 細胞のエICOSAノイド産生を、PO-PG が抑えることを明らかにしている。このように、PO-PG における TLR-4 や TLR-2 のアンタゴニスト作用が報告され、その薬理的効果や作用機序の解明に注目が集まっている。本研究における EpPOH-PG にも PO-PG と同等以上の効果が期待され、この脂質の体内吸収性や動態、アンタゴニスト作用のメカニズム、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。

また、本研究は、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食品としての長く、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今後、慎重に検討していく必要がある。

5. おわりに

本研究では、機能性素材としてのスサビノリの用途開発を志向して、スサビノリ由来脂質中の抗炎症作用を有するリン脂質の特定化を試みた。その結果、

- 1) 活性化マクロファージからの NO/サイトカイン産生を抑制する新規リン脂質 1-eicosapentaenoyl-2-(3-hydroxypalmitoyl)-phosphatidylglycerol (EpPOH-PG)を特定した。
- 2) リン脂質クラスの中では、phosphatidylglycerol に強い抗炎症作用を認め、また、不飽和脂肪酸が結合したリン脂質の方が、より作用が強い傾向が認められた。

なお、本研究に使用したマイクロプレートリーダー、高速液体クロマトグラフ、エレクトロスプレーイオン化-イオントラップ型質量分析装置及びガスクロマトグラフィー-質量分析装置は電源立地地域対策交付金の補助によるものである。

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) 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).
- 5) Erridge C, Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or antagonists? *J. Leuko. Biol.*, 87, 89-999 (2010).
- 6) 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 25 年漁業・養殖業生産統計.
- 7) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 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-. 平成 24 年度佐賀県工業技術センター報告, 1-9 (2013).
- 8) 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).
- 9) Araki S, Sakurai T, Omata T, Kawaguchi A and Murata N, Positional distribution of fatty acids in glycerol-lipids of the marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *Plant Cell Physiol.*, 28(5), 761-766 (1987).
- 10) 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
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) Kuronuma K, Mitsuzawa H, Takeda K, Nishitani C, Chan ED, Kuroki Y, Nakamura M and Voelker DR, Anionic Pulmonary Surfactant Phospholipids Inhibit Inflammatory Responses from Alveolar Macrophages and U937 Cells by Binding the Lipopolysaccharide-interacting Proteins CD14 and MD-2. *J. Biol. Chem.*, 284, 25488-25500 (2009).
- 14) Kandasamy P, Zarini S, Chan ED, Leslie CC, Murphy RC and Voelker DR, Pulmonary Surfactant Phosphatidylglycerol Inhibits *Mycoplasma pneumoniae*-stimulated Eicosanoid Production from Human and Mouse Macrophages. *J. Biol. Chem.*, 286, 7841-7853 (2011).