

藻類の産業利用に関する可能性研究(第 1 報)

-機能性を有する佐賀県産海藻資源の選抜-

食品工業部

柘植圭介 岩元彬 鶴田裕美

公益財団法人佐賀県地域産業支援センター

さがフード&コスメラボ 山内良子

佐賀県産の海藻類の新たな産業利用を志向し、機能性を有する海藻資源を選抜することを目的として、玄界灘に生息する海藻類の機能性及び有用成分の含量を調査した。唐津市松島にて採取した海藻類のうち、クロメ、アラメ、ノコギリモク、ヨレモク及びウミウチワに抗酸化活性が認められ、タマイタダキ、ケヤリ及びノコギリモクに抗炎症作用が認められた。抗炎症作用が見いだされたノコギリモク *Sargassum macrocarpum* の活性成分を特定すべく、溶媒分画及びクロマトグラフィーによる分画を試みた。その結果、ノコギリモクに含まれる抗炎症性化合物として、meroterpenoids の一種である sargaquinoic acid 及び sargahydroquinoic acid が推定された。以上の結果は、食品や化粧品分野等における機能性素材としての玄界灘産海藻類の活用、なかでも抗炎症性素材としてのノコギリモクの新たな活用を示唆するものである。

1. はじめに

わが国では、海藻類は非常に馴染みの深い食材である。古くから、ノリやワカメをはじめ多くの種類の海藻が食されている。また、海藻類はただ食材としてだけではなく、古くから、アルギン酸やアガロース（寒天）などのゲル化・増粘剤の抽出原料としても活用されている。最近では、コンブなどの褐藻綱に含まれるフコイダンやフコキサンチン等の成分に健康維持に役立つ生理機能が認められ、機能性食品の素材としても注目されている。

佐賀県は、有明海と玄界灘の2つの海に接している。なかでも玄界灘沿岸の岩礁域には100種類近くの藻類が生息¹⁾しているが、そのうち食用とされるのはワカメやヒジキなどごく一部である。一方で、佐賀県では、化粧品原料としての天然資源の供給地化や化粧品産業の集積を目指す「唐津コスメティック構想」²⁾や、機能性食品分野における新技術・新商品の開発を目指す「さが機能性・健康食品開発拠点事業」³⁾を推進している。これらの取り組みによる農林水産資源の有効利用を通じ、新たな産業の創出と地域の活性化が期待されている。

そこで、玄界灘に生息する藻類の中から、機能性食品や化粧品分野における機能性を有する資源を選抜し、さらにそれらの利用法を開発することにより、新たな産業利用に結び付けることを目的として研究を実施した。本研究では、玄界灘沿岸域に生息する

藻類を採集し、有望素材の選抜のための機能性評価や成分分析を実施した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 海藻類の採集

佐賀県唐津市松島沿岸を採集地とし、2017年5月10日から11日にかけて海藻類を採集した。採集はSCUBA潜水法により実施し、水深10m以浅の海底に生息する藻類を対象とした。採集した藻類は陸揚げ24時間以内に水道水で洗浄し、減圧乾燥に供した。乾燥物はカッターミルで粗粉碎・均質化し、品質劣化を防ぐため-18℃で保管した。

2.2 試薬類

本研究における試薬は以下のものを用いた：ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific HyClone), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 培地; Thermo Fisher Scientific Gibco), リポ多糖 (LPS; *Escherichia coli* 0111:B4 由来; 和光純薬工業, 以下和光と略す), mouse TNF- α ELISA Kit (Mouse ELISA Ready-SET-Go!; Affymetrix eBioscience), Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; 東京化成工業), Trolox (フナコシ), fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich), 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH; 和光), Folin-Ciocalteu 試薬 (和光), phloroglucinol (東京化成工業), フコキサンチン (和光)。

マウスマクロファージ様細胞 RAW 264.7 は、理研バイオリソースより入手した。また、有機溶媒及び緩衝液は、特に記載しない限り和光製の特級またはクロマトグラフィー用試薬を用いた。

2.3 機能性の評価

2.3.1 藻類抽出液の調製

試料粗粉末を高速振動粉碎機（（株）CMT, Hi-speed vibrating sample mill T1-100）を用いて微粉化した。微粉末約 1g に 80% (v/v) aq. ethanol 10mL を添加し、攪拌を加えながら 1 時間抽出した。遠心分離（1,500 x g, 10 min）により抽出液を回収し、抽出残渣に再度同溶媒 10mL を加え、30 分間再抽出した。遠心濃縮により抽出液から溶媒を留去し、乾固物を 10 mg/mL になるよう 80% aq. ethanol に再溶解して、これを試料溶液とした。試料溶液は品質劣化を防止するため、-30℃で保管した。

2.3.2 抗酸化活性

DPPH ラジカル消去活性及び活性酸素吸収能（ORAC）を指標として抗酸化活性を測定した。

DPPH ラジカル消去活性の測定は、須田らの方法⁴⁾に準じた。すなわち、96 ウェルマイクロプレートに 200 mM MES 緩衝液（pH6.0）50 μ L 及び所定濃度で希釈した試料溶液 50 μ L を加え、攪拌した。ethanol に溶解した 200 μ M DPPH 溶液を加え、室温で 20 分間反応後、マイクロプレートリーダー（Molecular Devices, Spectra Max M5）を用いて 520 nm の吸光度を測定した。抗酸化物質 Trolox を標準物質として検量線を作成し、DPPH の退色率から算出される DPPH ラジカル消去能を、試料の乾燥重量当たりの Trolox 当量として表した。

また、ORAC は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の H-ORAC 分析法標準作業手順⁵⁾に準じ、蛍光マイクロプレートリーダー（TECAN, Infinite 200 PRO）を用いて測定した。96 ウェルマイクロプレートにブランク（リン酸緩衝液）及びリン酸緩衝液で希釈した試料溶液もしくは Trolox 35 μ L を分注し、各ウェルに 100.7 nM fluorescein sodium salt 溶液 115 μ L を加えた。10 分間のプレインキュベーション後、31.7 mM AAPH 50 μ L を加えて攪拌後、蛍光強度を測定した。ORAC 値は、蛍光強度の減衰曲線下面積を算出し、検量線から試料の乾燥重量当たりの Trolox 当量として表した。測定条件の詳細は表 1 のとおりとした。

2.3.3 抗炎症作用

抗炎症作用は既報⁶⁾に準じて 96 ウェルマイクロ

表 1 ORAC 分析条件

項目	条件
励起波長	485 nm
蛍光波長	535 nm
測定間隔	2 min
測定時間	90 min
測定回数	46 回
測定温度	37℃

プレートを用いた細胞試験で評価し、エンドトキシンである LPS の誘導によりマウスマクロファージ様細胞 RAW 264.7 が産生する炎症性物質（一酸化窒素（NO）及び腫瘍壊死因子- α （TNF- α ））の産生阻害の程度を抗炎症の指標とした。

細胞は、37℃、5%CO₂ 環境下、10%FBS 含有 DMEM 培地で培養した。細胞試験時の細胞密度は 2×10^5 cells/mL、ウェルあたりの培地量は 200 μ L、LPS 添加濃度は 10 ng/mL とした。また、試料は 80% aq. ethanol に濃度 10 mg/mL で再溶解し、予め精密ろ過により滅菌した試料溶液を所定濃度で培地に希釈して添加した。ただし、対照区には、試料添加培地と同一濃度になるよう ethanol を添加した。

NO 産生量は LPS 添加 20 時間後の培地における NO₂ 蓄積濃度を Griess 法⁷⁾で測定することによって表した。また、TNF- α 産生量は、LPS 添加後 6 時間後の培地における TNF- α 濃度を ELISA 法⁸⁾により測定した。いずれも、以下の式により産生阻害率を算出した。

$$\text{産生阻害 (\%)} = 1 - \frac{Aa - Ab}{Ac - Ab} \times 100$$

ここで、Aa は試料添加培地の炎症性物質濃度を、Ab はブランク培地の炎症性物質濃度を、Ac は対照培地の炎症性物質濃度を示している。ただし、ブランク培地は LPS 無添加培地、対照培地は試料添加培地と同一濃度の ethanol を含む培地とする。

細胞試験に際しては、妥当性確認のため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。NO 産生試験と同一条件で試料及び LPS の存在下 20 時間培養し、培地を一旦除去後、Cell Counting Kit-8 を含む培地（2 μ L reagent/98 μ L 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、対称区における ΔA に対する試料添加区の ΔA の比で表した。

2.4 成分分析

2.4.1 総ポリフェノール

総ポリフェノール量の測定は既報⁸⁾に準じ、Folin-Ciocalteu 法⁹⁾を一部改良して行った。すなわち、96 ウェルマイクロプレートに 10 μ L の試料溶液を加え、10 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 75 μ L を加えて攪拌し、室温で 5 分間静置した。さらに、2%炭酸ナトリウム溶液 75 μ L を加え、攪拌し、室温で 15 分間静置後、750 nm の吸光度を測定した。試料溶液は各海藻試料の 80% aq. ethanol 抽出液とし、phloroglucinol を標準物質として検量線を作成した。総ポリフェノール含量は、乾燥重量当たりの phloroglucinol 当量として表した。

2.4.2 フコキサンチン

Terasaki らの手法¹⁰⁾を改変して試料中のフコキサンチン含量を測定した。すなわち、100 mg の試料微粉末に 5 mL の methanol を添加し、遮光下攪拌しながら 1 時間抽出した。遠心分離により抽出液を回収し、抽出残渣に methanol を加えて 30 分再抽出した。遠心濃縮により抽出液から溶媒を留去し、chloroform 10 mL, methanol 5 mL, 水 3 mL を順次加えて振とうし、上層を取り除いてこれを濃縮し、methanol/ acetonitrile = 7/3 (v/v) 2 mL に再溶解させて抽出液とした。

抽出液中のフコキサンチン濃度は、表 2 の条件にしたがい、フォトダイオードアレイ検出-高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。抽出液のフコキサンチン濃度から、海藻試料中のフコキサンチン含量を算出した。

2.5 抗炎症作用に関与する成分の分画と推定

2.5.1 関与成分の溶媒分画

供試試料のうち抗炎症作用を認めたノコギリモク *Sargassum macrocarpum* を対象に、高速溶媒抽出による関与成分の溶媒分画を行った。試料微粉末 3 g と海砂 12 g とを混合後、高速溶媒抽出装置 (Thermo Fisher Scientific Dionex, Model ASE-350) の抽出セル (22 mL 容) に充填し、表 3 の分画条件にしたがって *n*-hexane, ethanol 及び 75, 50, 25% (v/v) 含水 ethanol (v/v) の 5 種類の溶媒で順次抽出した。各々の溶媒分画物はいったん溶媒を留去して乾固物の重量を測定した後、同一の溶媒に再溶解させ、さらにろ過により不溶物を除去して分画液とした。ただし、*n*-hexane 抽出画分については ethanol に再溶解させた。溶媒分画物の抗炎症作用を 2.3.3 の手法に準じて測定し、活性が最も強い画分についてはさらなる分画に供した。

2.5.2 関与成分の HPLC による分画及び質量分析

HPLC を用いて、抗炎症作用が強かった溶媒分画物を細分画した。分取の条件は表 4 に従い、各画分の抗炎症作用を 2.3.3 と同一の条件で測定した。

HPLC 分画物のうち、抗炎症作用が最も強い画分を HPLC-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 (LC-ITMS) に供した。LC-ITMS の条件は表 5 に示した。

表 2 HPLC によるフコキサンチンの分析条件

項目	条件
装置	1100 series (Agilent Technologies)
カラム	Cadenza CD-C18, ϕ 2 X 250 mm with guard (Imtakt Corp.)
移動相	A: water/methanol/formic acid = 20/80/0.1 (v/v), B: acetonitrile/ethyl acetate/formic acid = 70/30/0.1 (v/v). 0 $\rightarrow$ 20 min: B $\rightarrow$ 100% with linear gradient, 20 $\rightarrow$ 30 min: hold at B100%
流量	0.2 mL/min
検出	photodiode array at 450 nm
カラム温度	40°C
注入量	3 μ L

表 3 高速溶媒抽出による溶媒分画条件

項目	条件
抽出溶媒	① <i>n</i> -hexane ② ethanol ③ 75% 含水 ethanol (v/v) ④ 50% 含水 ethanol (v/v) ⑤ 25% 含水 ethanol (v/v) ① $\rightarrow$ ② $\rightarrow$ ③ $\rightarrow$ ④ $\rightarrow$ ⑤ の順に抽出
加熱温度	40°C
加熱時間	5 min
静置時間	5 min
サイクル数	5 回
リンス量	75%
窒素パージ	200 sec

表 4 HPLC による分画条件

項目	条件
装置	U3000 (Thermo Fisher Scientific Dionex)
カラム	Unizon UK-C18, ϕ 2 X 250 mm with guard (Imtakt Corp.)
移動相	A: water, B: acetonitrile. 0 $\rightarrow$ 20 min: B $\rightarrow$ 97% with linear gradient, 20 $\rightarrow$ 40 min: hold at B97%
流量	0.2 mL/min
検出	UV at 255 nm (scan range: 210-400 nm)
カラム温度	40°C
注入量	12 μ L of 7,700 μ g/mL sample in ethanol
分取回数	27 回反復

表 5 LC-ITMS によるノコギリモク分画物の分析条件

項目		条件
HPLC	装置	1100 series (Agilent Technologies)
	カラム	Unizon UK-C18, $\phi 2 \times 250$ mm with guard (Imtakt Corp.)
	移動相	A: water/formic acid = 100/0.1 (v/v), B: acetonitrile/water/formic acid = 96/4/0.1 (v/v), 0→20 min: B3-97% with linear gradient, 20→30 min: hold at B97%
	流量	0.2 mL/min
	検出	UV at 255 nm
	カラム温度	40°C
	注入量	3 μ L
MS	装置	HCT Ultra (Bruker)
	イオン源	Unizon UK-C18, $\phi 2 \times 250$ mm with guard (Imtakt Corp.)
	極性	alterantive mode
	イオン源温度	350°C
	ネブライザーガス圧	45 psi
	ネブライザーガス流量	8 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
	スキャン速度	8,100 m/z/sec

3. 結果及び考察

3.1 採集した藻類

本研究により採集した海藻類は表 6 のとおりである。褐藻綱 17 種, アオサ藻綱 2 種, 真正紅藻綱 4 種, 計 23 種の藻類が得られた。褐藻綱ウミウチワ属の 1 種を除き, すべて種の同定に至っている。採取した海藻類のうち, 生育状況が良好で, 資源量が比較的多かったのは, アラメ, クロメ, ノコギリモク, ワカメ, アオワカメ, アカモクの 6 種であった。

3.2 機能性評価

海藻抽出物の DPPH ラジカル消去活性, ORAC 値及び NO 産生阻害活性を表 7 に示した。DPPH ラジカル消去活性については, クロメ, アラメ, ノコギリモク, ヨレモク, ウミウチワの 5 種が特に活性が高かった。また, ORAC 値については, クロメ, アラメ, ノコギリモク, ヨレモクの 4 種が特に高い値を示した。抗酸化性が高かったのは総て褐藻綱であった。

NO 産生阻害活性においては, 細胞への添加濃度 10 μ g/mL でタマイタダキ, ケヤリ及びノコギリモクの 3 種に 20%以上の NO 産生阻害が認められた。なお, NO 産生阻害活性試験における細胞障害性は,

すべての試料において添加濃度 10 μ g/mL 以下では認められなかった (データ示さず)。

3.2 成分含量

総ポリフェノール含量及びフコキサンチン含量を表 7 に示した。総ポリフェノールについては, クロメ, アラメ, ウミウチワ, ヨレモク, ノコギリモクの 5 種が特に含量が多かった。また, フコキサンチンについては, ケヤリ, クロメ, エンドウモク, アオワカメの 4 種が特に含量が多かった。

本研究で評価した機能性のうち, 抗酸化活性と, 測定した成分含量との間の相関性を調べたところ, 図 1 に示すように抗酸化活性, 特に DPPH ラジカル消去活性と, ポリフェノール含量との間に高い正の相関が認められた。この結果は, 海藻における抗酸化活性の主たる関与成分は, ポリフェノール類であることを示唆するものである。

他方, 抗炎症作用の指標である NO 産生阻害活性と成分含量との間には, どちらの成分も相関性は認められなかった (図 2)。このことから, 抗炎症作用の関与成分は, 本研究で測定したポリフェノール類やフコキサンチンとは異なる物質であると考えられた。

表 6 唐津市松島沿岸で採集された海藻類の一覧

種名	学名	分類
1 ヨレモク	<i>Sargassum siliquastrum</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属バクトロフィクス亜属ハロクロア節
2 ウミウチワ	<i>Padina arborescens</i>	褐藻綱アミジグサ亜綱アミジグサ目アミジグサ科シマオウギ連ウミウチワ属
3 アラメ	<i>Ecklonia bicyclis</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱コンブ目コンブ科カジメ属
4 クロメ	<i>Ecklonia kurome</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱コンブ目コンブ科カジメ属
5 フクロノリ	<i>Colpomenia sinuosa</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱シオミドロ目カヤモノリ科フクロノリ属
6 ノコギリモク	<i>Sargassum macrocarpum</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属バクトロフィクス亜属ハロクロア節
7 ケヤリ	<i>Sporochmus radiformis</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ケヤリモ目ケヤリモ科ケヤリ属
8 ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱コンブ目チガイソ科ワカメ属
9 アオワカメ	<i>Undaria peterseniana</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱コンブ目チガイソ科ワカメ属
10 ホンダワラ	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属バクトロフィクス亜属テレティア節
11 アカモク	<i>Sargassum horneri</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属バクトロフィクス亜属スポンゴカルプス節
12 トゲモク	<i>Sargassum microcanthum</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属バクトロフィクス亜属ハロクロア節
13 シマウラモク	<i>Sargassum incanum Grunow</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属バクトロフィクス亜属ハロクロア節
14 マメタワラ	<i>Sargassum piluliferum</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属ホンダワラ亜属
15 エンドウモク	<i>Sargassum yendoi</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱ヒバマタ目ホンダワラ科ホンダワラ属ホンダワラ亜属
16 ウミウチワ属の一種	<i>Padina sp.</i>	褐藻綱アミジグサ亜綱アミジグサ目アミジグサ科シマオウギ連ウミウチワ属
17 カゴメノリ	<i>Hydroclathrus clathratus</i>	褐藻綱ヒバマタ亜綱シオミドロ目カヤモノリ科カゴメノリ属
18 タマミル	<i>Codium minus</i>	アオサ藻綱ハネモ目ハネモ亜目ミル科ミル属
19 イトミル	<i>Codium tenue</i>	アオサ藻綱ハネモ目ハネモ亜目ミル科ミル属
20 フサノリ	<i>Scinaia japonica</i>	真正紅藻綱ウミゾウメン亜綱ウミゾウメン目ガラガラ亜目フサノリ科フサノリ属
21 ニセフサノリ	<i>Scinaia okamurae</i>	真正紅藻綱ウミゾウメン亜綱ウミゾウメン目ガラガラ亜目フサノリ科フサノリ属
22 タマイタダキ	<i>Delisea japonica</i>	真正紅藻綱マサゴシバリ亜綱カギノリ目カギノリ科タマイタダキ属
23 カニノテ	<i>Amphiroa dilatata Lamouroux</i>	真正紅藻綱サンゴモ亜綱サンゴモ目サンゴモ科イシゴロモ亜科カニノテ属

採集日：2017 年 5 月 10~11 日、採集場所：佐賀県唐津市松島。

種の同定は海藻研究所及び玄海地区海藻研究会による。また、同定された海藻の分類は、神戸大学内海域環境教育研究センターマリンサイト特命助教鈴木雅大氏が運営するサイト「生きものの好きの語る自然史」(<http://natural-history.main.jp/indexs.html>)に記載のものを引用している。

3.3 ノコギリモク由来の抗炎症性物質の推定

抗炎症作用を有する海藻類のうち、褐藻綱ノコギリモク *Sargassum macrocarpum* (図 3) は、活性の強さは中程度であったが、生育状況が良好で資源量が比較的多かった。資源量が豊富で、原料を安定に供給できることは産業利用の点に則して強みであると判断された。そこで、抗炎症作用を有する海藻としてノコギリモクに着目し、これに含まれる抗炎症性物質の推定を試みた。

高速溶媒抽出装置を用いた溶媒分画により 5 種の溶媒で分画したもののうち、NO 産生阻害活性が最も強かったのは *n*-hexane 抽出物であった (表 8)。これをさらに HPLC に供し、検出波長 250 nm で描かれたクロマトグラムから、ピークパターンを考慮して 10 の画分に分けた (図 4)。各々の画分の NO 及び TNF- α の産生阻害活性を比較したところ、表 8 に示すように画分 3 及び画分 7 に特に強い阻害活性が認められ、その強さは画分 3 > 画分 7 であった。

次に、LC-MS による画分 3 及び 7 の解析結果を図 5 及び 6 にそれぞれ示す。画分 3 においては、保持時間 23.2 分と 26.7 分に主要なピークが検出された。それぞれのピークを Peak X, Peak Y とし、Peak X の MS スペクトルを見た結果、Peak X の分子量関連イオンとして m/z 427 (正イオン)、 m/z 425 (負イオン) が検出された。また、photodiode array 検出における吸収極大は 291 nm であった。一方、Peak Y の分子量関連イオンとして m/z 425 (正イオン)、 m/z 423 (負イオン) が検出された。また、photodiode array 検出における吸収極大は 254 nm であった。これらのことから、Peak X は、モノアイソトピック質量 426 で、波長 290 nm 付近に吸収極大を有する物質であることが予想される。これを化合物 X とする。また、Peak Y はモノアイソトピック質量 424 で、波長 254 nm 付近に吸収極大を有する物質であることが予想される。これを化合物 Y とする。

一方、画分 7 においては、保持時間 26.7 分に主要

表 7 唐津市松島沿岸で採集された海藻類の機能性¹及び成分含量

測定項目	機能性			成分含量	
	抗酸化活性		NO産生 阻害活性 ²	総ポリ フェノール	フコキサンチン
	DPPHラジカル 消去活性	ORAC値			
単位	mg Trolox当量/g 乾燥粉末		%	mg Phloroglucinol当量/g 粉末	mg/100g 乾燥粉末
1 ヨレモク	42 ± 1	64 ± 0	-13 ± 10	36	70
2 ウミウチワ	32 ± 1	39 ± 1	-18 ± 10	38	94
3 アラメ	69 ± 2	172 ± 1	-13 ± 13	103	99
4 クロメ	96 ± 2	397 ± 1	-4 ± 8	126	128
5 フクロノリ	3 ± 1	14 ± 0	1 ± 17	3	90
6 ノコギリモク	43 ± 3	91 ± 1	20 ± 4	35	69
7 ケヤリ	4 ± 1	20 ± 1	31 ± 5	7	192
8 ワカメ	13 ± 3	20 ± 1	-29 ± 7	20	59
9 アオワカメ	9 ± 2	15 ± 0	-13 ± 9	11	115
10 ホンダワラ	N.D.	8 ± 0	-22 ± 9	2	38
11 アカモク	12 ± 3	56 ± 1	-2 ± 12	15	99
12 トゲモク	21 ± 3	48 ± 0	-3 ± 7	24	80
13 シマウラモク	2 ± 0	23 ± 1	-1 ± 7	2	96
14 マメタワラ	8 ± 2	37 ± 1	6 ± 4	12	87
15 エンドウモク	11 ± 3	51 ± 1	-50 ± 11	17	120
16 ウミウチワ ^{sp.}	9 ± 2	56 ± 0	-46 ± 17	32	94
17 カゴメノリ	3 ± 1	12 ± 0	-34 ± 9	2	84
18 タマミル	N.D.	11 ± 0	-42 ± 19	1	7
19 イトミル	N.D.	N.D.	-12 ± 17	2	N.D.
20 フサノリ	N.D.	N.D.	-6 ± 9	1	N.D.
21 ニセフサノリ	N.D.	N.D.	-8 ± 13	1	N.D.
22 タマイタダキ	N.D.	N.D.	76 ± 3	2	N.D.
23 カニノテ	N.D.	N.D.	-11 ± 12	N.D.	N.D.

¹機能性におけるデータは平均値±SDで表した (n=3 or 4) . 成分含量におけるデータは2測定の平均値で表した。²試料添加濃度 : 10 µg/mL.

なピークが検出され、保持時間及び MS スペクトルは画分 3 において観察された Y と同一であった。

Peak X と Peak Y の溶出時間は 3.5 分離れており、クロマトグラフィーによる分取作業中に、分離不十分による物質のオーバーラップや、相互にコンタミネーションを起こす可能性は低いと思われる。このことから、X と Y は構造的に類似し、経時的に X から Y への不可逆的変化を起こす化合物であることが予想された。そこで、画分 3 を常温下放置し、経時的な HPLC のパターン変化をみた。その結果、図 7 に示すように経時的に X は減少し、逆に Y が増加することが明らかとなった。この観察結果より、X

は、温和な条件のもと、徐々に Y へ構造変化する化合物であることが推察された。

X→Y への質量数 2 の減少から、2 個の水素原子の脱離を伴う脱水素化反応が想起される。特に、この反応が、常温という温和な条件で生じていることから、酸化に伴う脱水素化反応、例えば、2 級アルコールやジフェノールの酸化による、ケトンやキノンの生成が生じている可能性が考えられる。

Segawa らは、褐藻綱エゾノネジモク *Sargassum yezoense* から、meroterpenoids の一種である sarga-hydroquinoic acid を単離し、その構造¹¹⁾を明らかにしている (図 8)。この物質はテルペンにメチルヒド

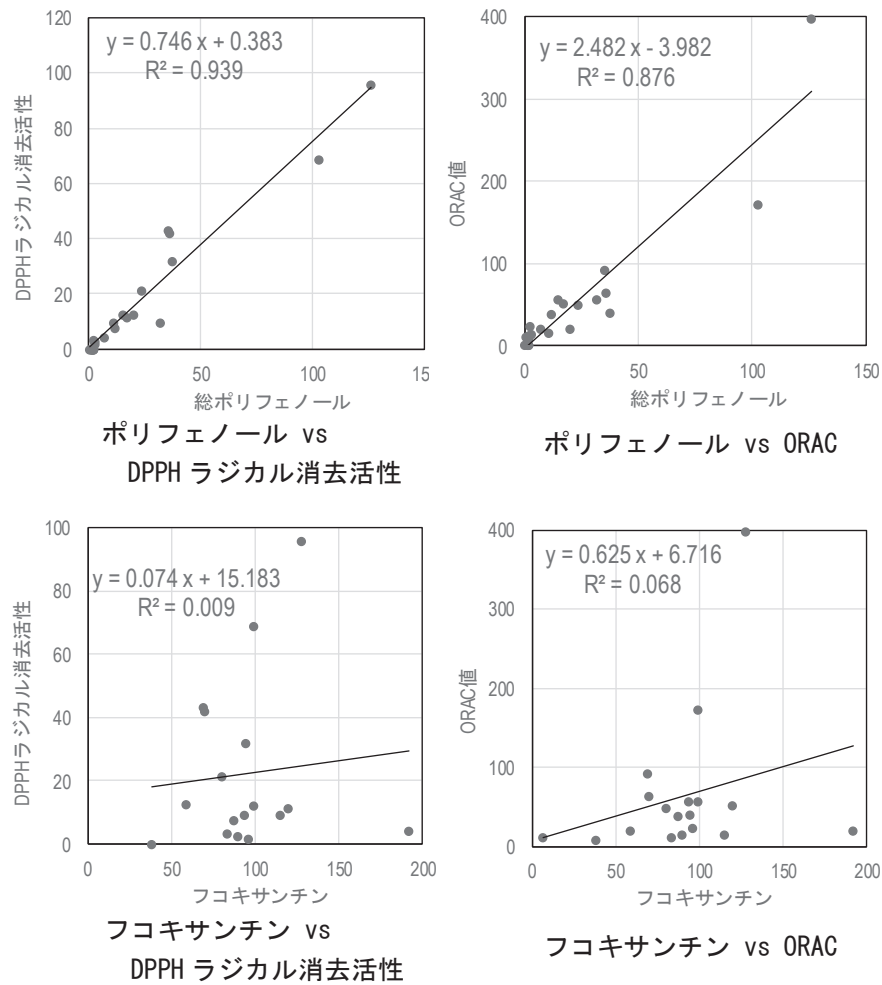


図 1 海藻類の抗酸化活性-成分含量相関

抗酸化活性-フコキサンチン相関図については褐藻綱のみを対象とした

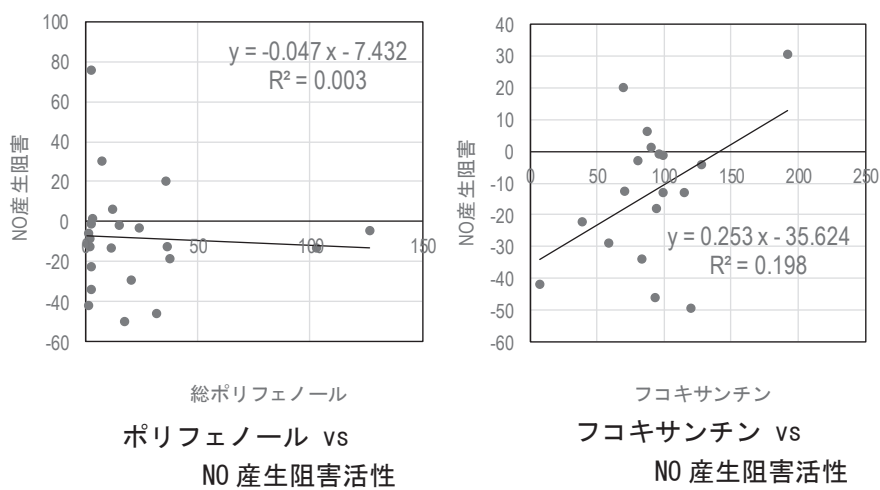


図 2 海藻類の NO 産生阻害活性-成分含量相関

NO 産生阻害-フコキサンチン相関図については褐藻綱のみを対象とした



図 3 ノコギリモク *Sargassum macrocarpum*
上：松島におけるノコギリモク群落
下：ノコギリモク生標本

表 8 ノコギリモク由来抗炎症性画分の分画 単位:%

画分	NO産生阻害率	TNF-α産生阻害率	WST-8活性
溶媒分画			
25% aq. ethanol	7.7 ± 6.2	(未測定)	99.4 ± 3.3
50% aq. ethanol	8.4 ± 5.0		99.1 ± 1.3
75% aq. ethanol	-5.5 ± 3.5		92.2 ± 0.8
ethanol	3.5 ± 3.0		100.3 ± 3.5
n- hexane	24.4 ± 5.6		120.4 ± 6.3
n- hexane画分→HPLC			
画分1	-8.3 ± 3.0	0.4 ± 4.5	79.9 ± 20.8
画分2	24.1 ± 1.1	22.1 ± 1.5	97.0 ± 5.5
画分3	78.8 ± 4.0	59.2 ± 1.2	93.9 ± 4.2
画分4	13.7 ± 6.1	24.5 ± 4.6	101.6 ± 2.8
画分5	4.6 ± 8.5	14.0 ± 17.6	101.4 ± 1.5
画分6	16.8 ± 3.5	22.8 ± 9.5	97.7 ± 8.1
画分7	22.1 ± 5.0	33.2 ± 5.8	101.8 ± 1.2
画分8	10.5 ± 3.2	10.2 ± 8.6	100.6 ± 1.7
画分9	12.1 ± 2.0	28.1 ± 3.8	101.6 ± 0.4
画分10	5.3 ± 6.7	21.7 ± 3.4	104.2 ± 0.7

溶媒分画物：10μg/mL で細胞に添加した。
HPLC 画分：分画液を 200 倍希釈して細胞に添加した。

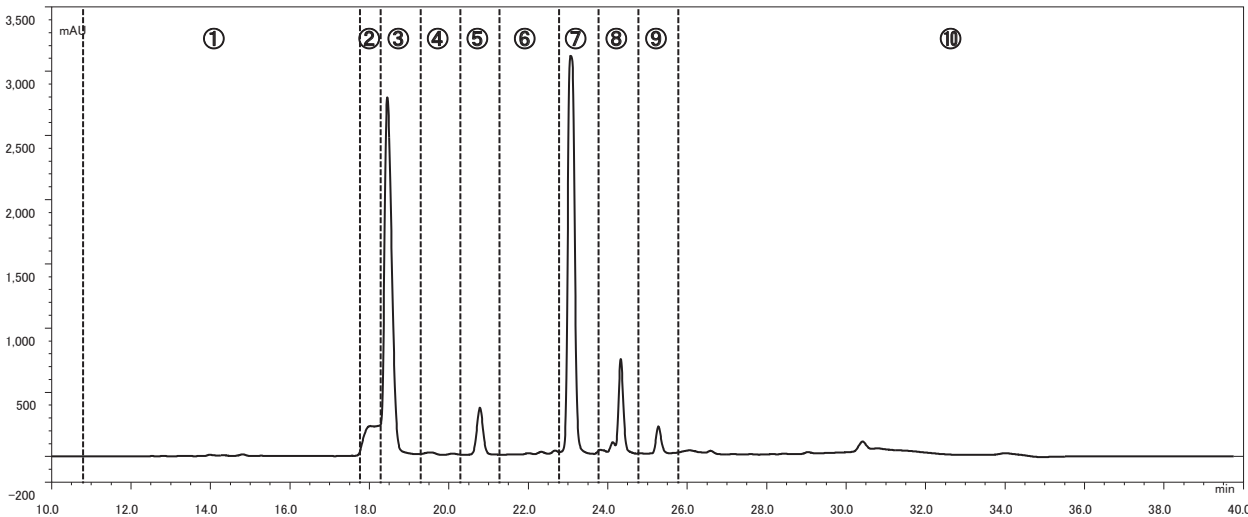


図 4 ノコギリモク由来 *n*-hexane 抽出画分の HPLC による細分画
波長 250nm におけるクロマトグラムをもとに、ピークパターンを考慮して 10 画分に分画。
それぞれの画分は溶媒を留去後、0.5 mL の ethanol に溶解させ、200 倍の希釈率で細胞に添加した。

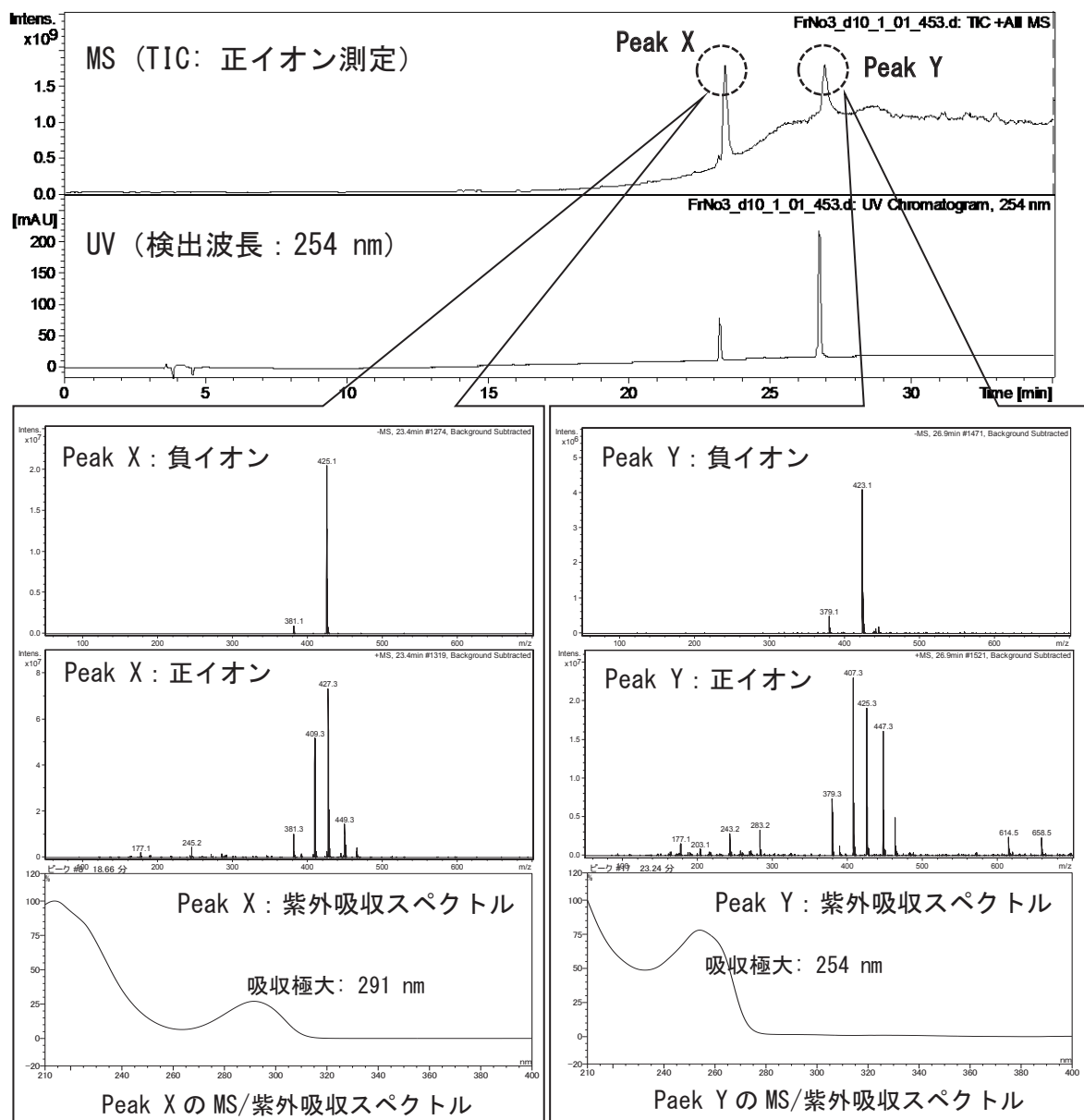


図5 ノコギリモク由来抗炎症性画分（画分3）のLC-MS解析

保持時間 23.2 分と 26.7 分に主要なピーク（Peak X, Peak Y）が検出された。

Peak X : MS スペクトルにおいて m/z 427（正イオン）, m/z 425（負イオン）が検出。吸収極大：291 nm。

Peak Y : MS スペクトルにおいて m/z 425（正イオン）, m/z 423（負イオン）が検出。吸収極大：254 nm。

ロキノンが結合したユニークな構造を有し、モノアイソトピック質量は 426 である。また、空気中で徐々に酸化して質量数が 2 低い sargaquinoic acid になることが報告¹¹⁾されている。

以上の観察結果及び既報から、画分3に含まれる X は, sargahydroquinoic acid, そして画分3及び画分7に含まれる Y は, sargaquinoic acid であることが推察される。しかしながら、X 及び Y の構造を決定させるには、核磁気共鳴法等を用いたさらなる解析が

必要であろう。

sargaquinoic acid（以後 SQA と呼ぶ）の抗炎症作用については既に複数の報告^{12,13)}があり、なかでも Joung らの研究は、ジョロモク *Myagropsis myagroides* 由来 SQA が LPS によって誘導された RAW264.7 細胞の炎症性応答を, Nf- κ B 及び Nrf2 経路の制御を通じて抑制するというもので、ノコギリモク由来の化合物 Y が SQA であることを裏付ける報告である。

他方, sargahydroquinoic acid（以後 SHQA と呼ぶ）

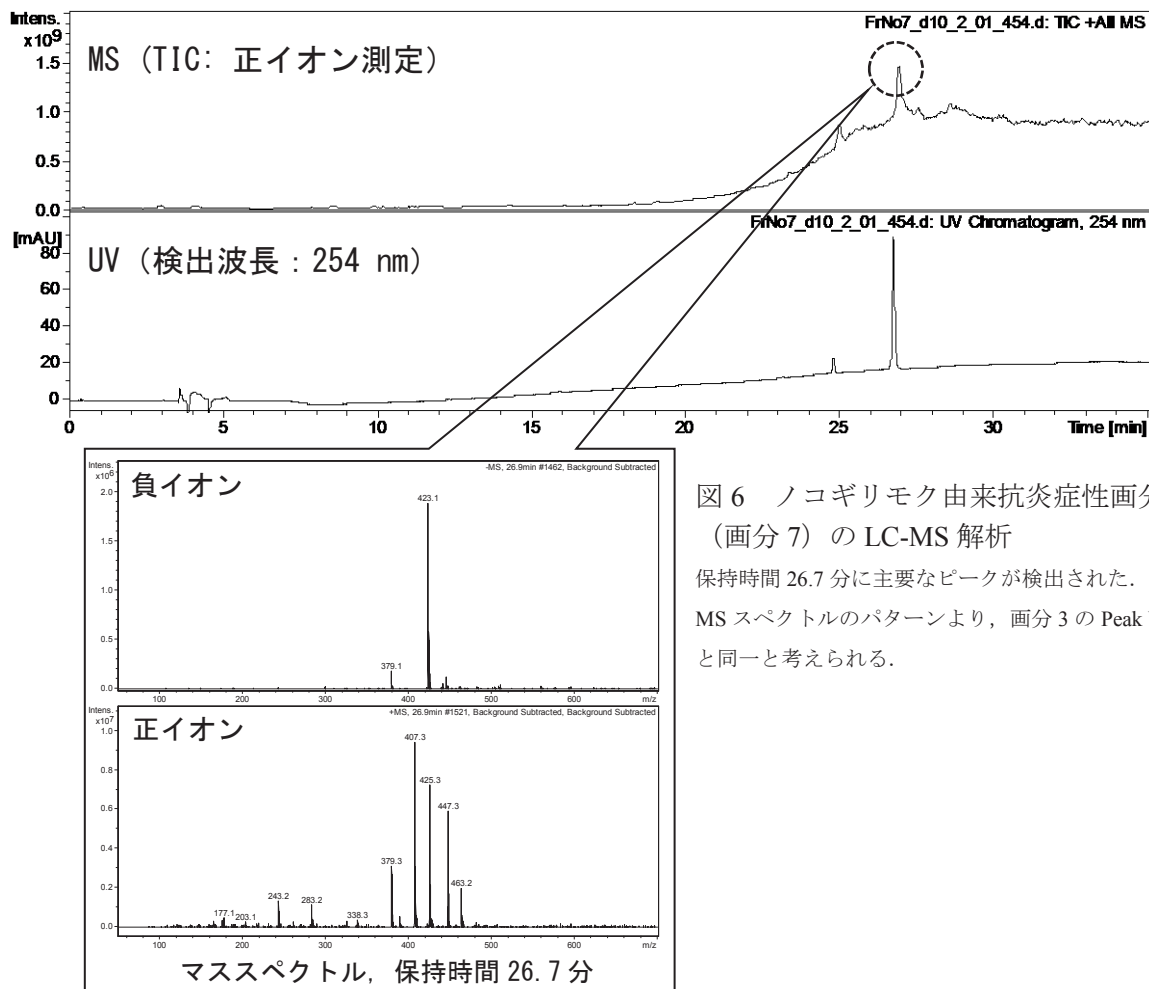


図6 ノコギリモク由来抗炎症性画分
(画分7)のLC-MS解析

保持時間 26.7 分に主要なピークが検出された.

MS スペクトルのパターンより、画分 3 の Peak Y と同一と考えられる。

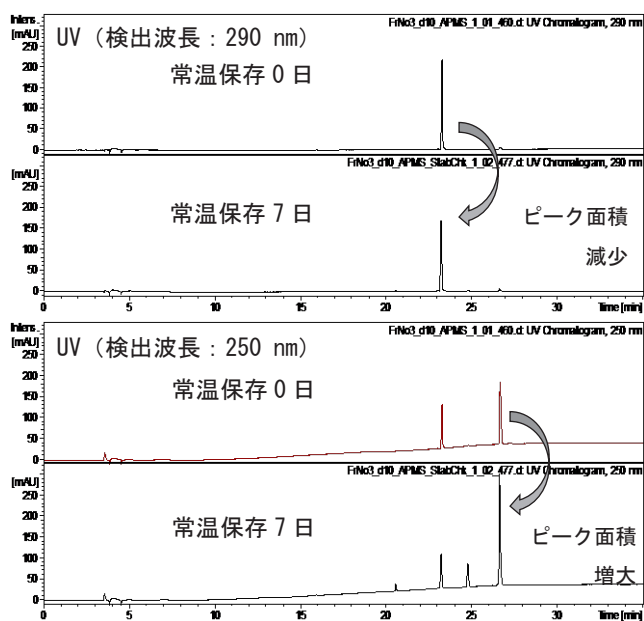


図7 ノコギリモク由来 画分3の経時変化
保持時間23.2分のピークの経時的な減少と保持時間26.7分の増大が見られる。

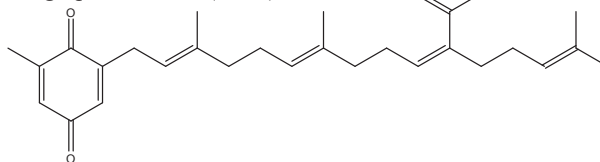
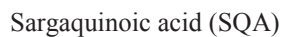
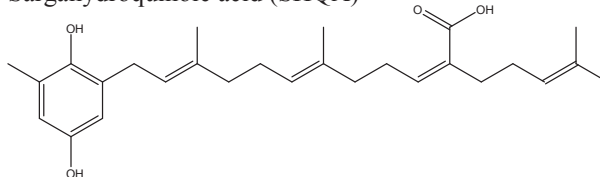


図 8 海藻由来 Meroterpenoids の分子構造

の抗炎症作用については、調査した範囲では報告例を見いだせなかった。今後、物質 X のさらなる精製を行い、その抗炎症作用について明確化していく必要が考えられた。

3.4 機能性素材としてのノコギリモク資源の可能性

SQA や SHQA 等の meroterpenoids には、抗炎症作用以外にも複数の生理機能¹⁴⁻¹⁶⁾が報告されている。

Kamei¹⁵⁾らは、SQA がラット副腎髄質由来神経系細胞 PC12D における神経突起伸長活性を有することを明らかにし、アルツハイマー型認知症の治療に役立つ可能性について言及している。また、Kim¹⁶⁾らは、エゾノネジモク由来の SQA や SHQA が、マウス線維芽細胞 3T3-L1 において PPAR α / γ 転写活性増強を介した脂肪細胞への分化誘導を促進することを明らかにし、メタボリックシンドロームにおけるインスリン抵抗性の改善効果について言及している。

玄界灘産のノコギリモクは、現段階では、SQA や SHQA を有効成分とする機能性食品・化粧品の原料にふさわしい海藻資源だといえる。しかしながら、今回われわれが採集した海藻類は、玄界灘に生育するうちの 3 割にも満たず、また季節や場所ごとの含有量のばらつきについては全く知見がない。例えば、SHQA は、先述したエゾノネジモクのほか、褐藻綱トゲモク *Sargassum micracanthum*^{17,18)}や、キク科植物 *Roldana barba-johannis*¹⁹⁾にも含まれるとの報告があり、ノコギリモク以外の海藻でも供給源となり得る可能性が考えられる。

今後は、採集する海藻の種類や採取回数を増やして海藻類の抗炎症作用に関する広範な調査を行うとともに、他の機能性を有する海藻の選抜を行い、玄界灘に生息する未利用海藻の活用に向けて取り組む計画である。

4. おわりに

本研究では、佐賀県の玄海灘沿岸域に生息する海藻類の産業利用を志向し、唐津市松島産海藻類 23 種の機能性及び有用成分の含量を調査した。

その結果、

- 1) 採集した海藻類のうち、褐藻綱クロメ、アラメ、ノコギリモク、ヨレモク及びウミウチワに抗酸化活性が認められた。
- 2) 採集した海藻類のうち、真正紅藻綱タマイタダキ及び褐藻綱ケヤリ、ノコギリモクに抗炎症作用が認められた。
- 3) これらの機能性と成分含量との間の相関性を調べた結果、抗酸化活性とポリフェノール含量との

間に高い相関が認められた。一方、抗炎症作用については、ポリフェノール含量やフコキサンチン含量との間に相関性が認められなかった。

- 4) 抗炎症作用が見いだされたノコギリモク *Sargassum macrocarpum* の新たな抗炎症成分として、meroterpenoids の一種である sargaquinoic acid 及び sargahydroquinoic acid を推定した。

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、蛍光マイクロプレートリーダー、高速溶媒抽出装置及び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は電源立地地域対策交付金により導入した。

本研究の遂行にあたり海藻採集に多大なるご協力を賜った、松島の海士 宗勇氏、海藻研究所 新井章吾所長、玄海地区海藻研究会 飯田勇次会長、及び佐賀県立厳木高等学校 前田修之教頭に深謝の意を表する。新井所長及び飯田会長には、海藻の種の同定に際してもご指導いただいた。併せて感謝申し上げる。

5. 参考文献

- 1) 大津安夫, 金丸彦一郎, 佐賀県玄海域における藻場の現状と変動傾向, 佐賀県玄海水産振興センター研究報告, 6, 81-88 (2013).
- 2) 内閣府まち・ひと・しごと創生本部第 4 回地域しごと創生会議配布資料 3-6 (http://www.kantei.go.jp/jp/singi/sousei/meeting/chiiki_shigoto/h28-03-12-siryoku3-6.pdf) (2016).
- 3) <https://www.pref.saga.lg.jp/kiji00336234/index.html>
- 4) 須田郁夫, 食品機能研究法, 光琳, 218-220 (2000).
- 5) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, H-ORAC 分析法標準作業手順書, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所(2013).
- 6) 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 (2) -スサビノリにおける抗炎症性脂質の特定-. 平成 25 年度佐賀県工業技術センター報告, 19-28 (2014).
- 7) 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).

- 8) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬, 柘植圭介, 農産物の機能性を強化する加工条件の構築と応用, 平成 28 年度佐賀県工業技術センター報告, 49-53 (2017).
- 9) Sun T., Tang J., Powers J. R., Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (1), 42-48 (2005).
- 10) Terasaki M., Hirose A., Narayan B., Baba Y., Kawagoe C., Yasui H., Saga N., Hosokawa M., Miyashita K., Evaluation of recordable functional lipid components of several brown seaweeds (Pheophyta) from Japan with special reference to fucoxanthine and fucosterol contents, *J. Phycol.*, 45(4), 974-980 (2009).
- 11) Segawa M., Shirahama H., New plastoquinones from the brown alga *Sargassum sagamianum* var. *yezoense*, *Chem. Lett.*, 16 (7), 1365-1366 (1987).
- 12) Gwon W.G. et al., Sargaquinoic acid inhibits TNF- α -induced NF- κ B signaling, thereby contributing to decreased monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), *J. Agric. Food Chem.*, 63, 9053-9061 (2015).
- 13) Joung E. J. et al., Sargaquinoic acid attenuates inflammatory responses by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, *International Immunopharmacology*, 29, 693-700 (2015).
- 14) Hur S. et al., Sargaquinoic acid and sargachromenol, extracts of *Sargassum sagamianum*, induce apoptosis in HaCaT cells and mice skin: Its potentiation of UVB-induced apoptosis, *Eur. J. Pharm.*, 58, 21-11 (2008).
- 15) Kamei Y, Tsang C.K., Sargaquinoic acid promotes neurite outgrowth via protein kinase A and MAP kinases-mediated signaling pathways in PC12D cells, *Int. J. Devl. Neuroscience*, 21, 255-262 (2003).
- 16) Kim S.N. et al., Sargaquinoic acid and sargahydroquinoic acid from *Sargassum yezoense* stimulate adipocyte differentiation through PPAR α / χ activation in 3T3-L1 cells, *FEBS Lett.*, 582, 3465-3472 (2008).
- 17) Ham Y.M., et al., Chemical constituents from *Sargassum micracanthum* and antioxidant activity, *Int. J. Pharm.*, 6 (2), 147-151 (2010).
- 18) Park B.G. et al., Selective vasodilatation effect of sargahydroquinoic acid, an active constituent of *Sargassum micracanthum*, on the basilar arteries of rabbits, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 2624-2627 (2008).
- 19) Perez-Castorena A.L., Arciniegas A., Apan M.T., Villaseñor J.L., de Vivar A.R., Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of the plastoquinone derivatives isolated from *Roldana barba-johannis*. *Planta Med.*, 68, 645-647 (2002).