

アカモク(Sargassum horneri)抽出物の抗腫瘍性

誌名	北海道大学水産科学研究彙報
ISSN	13461842
著者名	松田,太一 佐々木,甚一 栗原,秀幸 羽田野,六男 高橋,是太郎
発行元	北海道大学大学院水産科学研究科
巻/号	56巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 75-86
発行年月	2005年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



アカモク (*Sargassum horneri*) 抽出物の抗腫瘍性

松田 太一^{1,2)}・佐々木甚一³⁾・栗原 秀幸¹⁾・羽田野六男⁴⁾・高橋是太郎¹⁾

(2005年8月31日受付, 2005年9月21日受理)

Anticancer Benefit of *Sargassum horneri* Extract

Taichi MATSUDA^{1,2)}, Jinichi SASAKI³⁾, Hideyuki KURIHARA¹⁾, Mutsuo HATANO⁴⁾ and
Koretaro TAKAHASHI¹⁾

Abstract

Sargassum horneri is an alga which can be seen in many coasts in Japan. And for this reason, it is expected to be more utilized as food. However, consumption of this alga has been very limited. The purpose of this study is to bear out the anticancer effect of extracts from *Sargassum horneri*, both *in vivo* and *in vitro*. Doses of extracts were done on Meth-A tumor bearing BALB/c female mice by injection and oral administration. *In vitro* studies were also done on Meth-A cell line using WST-1 dye reduction assay and trypan blue dye excursion method. Hot water extractive from *Sargassum horneri* showed a notable Meth-A tumor growth suppression, while the suppression by ethanol extractive was poor. The hot water extract also suppressed growth of the Meth-A cell line. Suppression was in part considered to be the result of apoptosis induced by sulfuric polysaccharide. The suppression effect was almost comparable to the well known fucoidan obtained from *F. vesiculosus*. We concluded that *Sargassum horneri* must be one of the most health beneficial edible algae especially for anticancer purpose.

Key words : *Sargassum horneri*, Anticancer, alga, Meth-A, Polysaccharide, Fucoidan, Hot water extract, Akamoku, Fibrosarcoma

緒 言

アカモク (*Sargassum horneri*) はホンダワラ科1年生の褐藻で、ヒジキなどと同じ科に属している。日本近海では太平洋沿岸の北海道日高以南、日本海側のサハリン以南に広く分布している。また、アジア地域では中国大陸沿岸、台湾、マカオにも分布している。地方によって呼び名が異なり、アカモクの他、ナガラモ (富山)、マメタワラ・ツブナガ (新潟)、シバサ・ギバザ (秋田) などと呼ばれている。このようにアカモクは全国的に分布しているにもかかわらず、食用として利用されているのは富山、秋田、新潟県の日本海側や、山形県の一部地域に限られている。他の利用方途として、一部で漁場の改善や藻場造成を図るため、海水中の窒素やリンの回収にアカモクの人工種苗が用いられている。しかし、現状は有効利用されているとはいえず、資源の有効利用を図る視点からその利用加工面での研究を推進することが求められている。これまで、アカモクには

抗腫瘍作用、抗ウィルス作用 (Hoshino et al., 1998)、抗トロンビン作用及びガン細胞増殖抑制、骨吸収抑制作用などが示唆されており、これらはアカモクに含まれる水溶性多糖の効果であると推察されている。さらにアカモクのメタノール抽出物に抗酸化作用が見出され、活性成分としてフコキサンチンが同定されている。

以上のように、アカモクには生体機能を改善する作用を有する機能性食品として、これから利用が期待される素材であるといえる。そこで本研究では有用機能性として先ず抗腫瘍性に着目し、繊維芽肉腫担ガンマウスに対する粗抽出物の治療効果の評価を行った。次いでその結果に基づき *in vitro* で繊維芽肉腫 Meth-A 細胞の増殖に及ぼす粗抽出物の影響及び成分の同定、そして既存の硫酸化多糖との活性比較、その成分の作用機序の一端を明らかにした。

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院生物資源利用学分野
(Laboratory of Marine Products and Food Science)

²⁾ 現所属: 月島食品工業株式会社
(Present address: Tsukishima Food Industry Co.Ltd)

³⁾ 弘前大学医学部
(Hirosaki University School of Medicine)

⁴⁾ 浅井学園大学
(Asai Gakuen University)

試 料 と 方 法

試料および試薬

アカモク (*Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh) は 2002 年 2 月に富山県で採取された食用として利用されているものと、2002 年 6 月に北海道江差の繁次郎浜で採取したものを水洗、風乾して用いた。その他の試薬、溶媒は特級、もしくは蒸留により精製したものをを用いた。

海藻の一般成分分析

水分定量は常圧加熱乾燥法に従い、110°C で 6~7 h 加熱して行った。粗タンパク質はケルダール法によって全窒素量を求め、6.25 を乗じて算出した。全脂質は Bligh & Dyer 法によって抽出、定量した。灰分は直接灰化法により 550°C で加熱分解後、秤量によって定量した。

アミノ酸組成の分析

アミノ酸組成の分析は試料を真空脱気下、定沸点 HCl 中で 110°C、24 h 加水分解反応を行い、エバポレーターで濃縮乾固後アミノ酸分析用緩衝液に溶解してアミノ酸自動分析装置 (JLC-500V, 日本電子 (株)) により定量した。

単純脂質・複合脂質の分離および脂質組成の分析

全脂質を Sep-Pak Vac シリカカートリッジ (Waters Associate 社) に供し、クロロホルムで単純脂質を溶出後、メタノールで複合脂質を溶出させた。それぞれ溶媒を留去した後、両画分の収量を測定した。脂質組成の分析は薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート (Merck, silica gel 60)ーデンシトメトリーによった。すなわち、単純脂質の脂質組成分析は *n*-ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=85:15:1 (v/v/v) で展開後、50% H₂SO₄を噴霧し、150°C でスポットが均一に発色するまで加熱した。その後スポットをスキャナーでパソコンに取り込み、Scion Image を用いて面積比から組成比を算出した。一方、複合脂質はクロロホルム:メタノール:25% アンモニア=65:25:5 (v/v/v) で展開し、展開終了後は上記の単純脂質と同様に行った。

粗アルギン酸の定量

アルギン酸の抽出は Na₂CO₃ 抽出法で行った。すなわち乾燥藻体の 3 倍量の 0.1 N H₂SO₄ 溶液を加えて室温で一晩振盪抽出後、抽出液を濾過して残渣を集め、先ず酸可溶多糖を除去した。次いで残渣を水洗した後、1% Na₂CO₃ 水溶液を残渣の 3 倍量加えて室温で一晩振盪抽出した。抽出液は粘性を示すため、水で 2~3 倍に希釈して濾過を容易にし、再び減圧濾過した。この操作を 2 回繰り返した。濾液に 2 倍容のエタノールを加え、粗アルギン酸ナトリウムを析出させた。エタノールおよびジエチルエーテルで洗浄、風乾し、減圧乾燥後、秤量して粗アルギン酸の収率を得た。

粗ラミナランの定量

粗可溶性ラミナランの抽出は HCl 抽出法 (Dische and Shetties, 1948) で行った。乾燥藻体の 3 倍量の 0.09 N HCl 溶液を加えて室温で 2 時間振盪抽出後、遠心分離 (3,000×g, 5 min) して上清を別の容器に移し、沈殿を少量の 0.05 N HCl 溶液で洗浄した。この操作を 2 回繰り返して、上清と洗浄液を合一し、エタノールを終濃度が 85% になるまで加えて沈殿を生成させた。遠心分離 (3,000×g, 5 min) して粗可溶性ラミナランを得た。次いで粗可溶性ラミナランを 50% になるように水に溶解し、これに 5% CPC を沈殿ができなくなるまで加え、混入する硫酸化多糖を沈殿させて除去した。上清を水に対し透析した後、内液にエタノールを終濃度が 85% になるまで加えて再び沈殿を生成させ、遠心分離 (3,000×g, 5 min) の後、沈殿をエタノール及びジエチルエーテルで洗浄後風乾し、秤量して粗ラミナランの収率を得た。

硫酸化多糖の定量

硫酸化多糖の抽出は HCl 抽出法で行った。すなわち、先ず乾燥藻体の 3 倍量の 0.17 N HCl を加えて 65~70°C で 1 h 抽出後、濾紙 (東洋濾紙 No. 1) を用いて濾過した。濾液を NaOH 水溶液で中和し、エバポレーターで減圧濃縮後、濃縮液に 2 倍容のエタノールを加えて、酸可溶多糖を沈殿として得た。得られた多糖を水に溶解して 4 M CaCl₂ 水溶液を加え、析出したアルギン酸を遠心分離 (3,000×g, 5 min) して除去した。この上清に 5% CPC (和光純薬 (株)) 水溶液を加え、CaCl₂ の終濃度が 0.5 M となるように水を加えた後 30°C で一晩放置した。析出した CPC 複合体を遠心分離 (3,000×g, 5 min) して集め、3 M CaCl₂ 水溶液で溶解し、2 倍容のエタノールを加えて再び沈殿を生成させた。この操作を 2 回繰り返して、沈殿をエタノールおよびジエチルエーテルで洗浄後、減圧乾燥後秤量して硫酸化多糖の収率を得た。

粗フコキサンチンの定量

乾燥藻体に 4 倍量のアセトンを加え、4°C、4 日間遮光下で抽出を行う操作を 2 回繰り返して、アセトン抽出物を得た。得られた抽出物を調製用 TLC プレート (Merck, silicagel 60) に負荷し、アセトン:*n*-ヘキサン=4:6 (v/v) で展開してオレンジ色の粗フコキサンチン画分をかき取り、アセトンで溶出した。溶媒を留去し、収量を測定した。

熱水抽出物構成単糖の定性分析

熱水抽出物を 2.0 mg/ml となるように 2.5 N HCl に溶解し、アンプル管に減圧封管した。ブロックヒーターで 100°C、12 h 加熱し、分解反応を行った。開封して BaCO₃ で中和後、内容物を半分程度になるまで減圧濃縮した。これを TLC プレート (Merck, silica gel 60) に供し、*n*-ブタノール:酢酸:水=2:1:1 (v/v/v) で展開後、フェノール硫酸

で発色させて同定した。

熱水抽出物構成単糖の定量分析

熱水抽出物 15 mg を 2 N H_2SO_4 6.0 ml に溶解し、100°C で 2.5 h 加水分解反応を行った。 BaCO_3 で中和後、濃縮乾固し、75% アセトニトリル 4.0 ml に溶解して、下記の条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を行った。

装置	HITACHI オートサンプラー L-7200 HITACHI ポンプ L-7100 SHIMAZU C-R7A plus
カラム	Shodex NH2P-50
溶媒	アセトニトリル:水=3:1 (v/v)
流速	0.8 ml/min
カラム温度	40°C (カラムオープン: TOSOH CO-8010)
検出器	HTACHI RI 検出器 L-7490

熱水抽出物のウロン酸量の測定

常法に従い、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.95 g を H_2SO_4 100 ml に溶解して試薬 A を調製した。カルバゾール 0.125 g を無水メタノール 100 ml に溶解し、試薬 B を調製した。熱水抽出物を 1.0 mg/ml となるように水に溶解し、この検液 1.0 ml に試薬 A を氷冷しながら 5.0 ml 加えて静置後、100°C で 10 min 加熱した。さらに氷冷しながら試薬 B を 0.2 ml 加え、100°C で 10 min 加熱後室温になるまで放冷し、530 nm の吸光値を測定した。D グルクロン酸 (D-GlcUA) を標準物質として用い、D-GlcUA 相当としてウロン酸 (UA) 含量を測定した。

熱水抽出物の硫酸基含量の測定

常法 (浅田ら編, 1981) に従い、熱水抽出物を 10 mg/ml となるように 3.5 N HCl に溶解し、100°C で 8 h 還流加熱を行って完全に加水分解させた。分解物を濾過し温水中で洗浄後、濾液を加温しながら 0.2 N BaCl_2 をゆっくり滴下し、 BaSO_4 の白色沈殿を生成させた。沈殿が生成しなくなったのを確認後、沈殿粒子を大きくするために 1 h 湯浴で加温し、1 h 静置した。熱湯を加えて攪拌し、デカンテーションを 3 回繰り返した。沈殿を濾過により回収し、温水中で沈殿を洗浄した。回収した沈殿に BaCl_2 が残っていないことを濾液に 0.1 N AgNO_3 を加えることで確認後、 BaSO_4 沈殿の重量を 550°C で灰化することにより測定し、硫酸基量に換算した。

動物実験による抗腫瘍性評価

局所投与による実験は次のように行った。

BALB/c マウスを 2 群に分け、投与群と対照群とした。 5.0×10^6 cells の BALB/c マウス由来腫瘍細胞 Meth-A fibrosarcoma を雌 ($n=5$) の皮内に移植した。移植した日を 0 日目とし、投与群には移植後 2, 4, 6 日目に各濃度に調整した試料溶液を 1.0 ml 腫瘍移植部位に直接注射した。移

植後 21 日目に腫瘍サイズ(長径 mm×短径 mm)を計測した。対照群には同様の操作で PBS のみを注射した。投与群と対照群の腫瘍サイズを比較し、投与効果を評価した。またこの時点で腫瘍増殖の認められないマウスは更に 1ヶ月観察し、腫瘍の再発のないことを確認して腫瘍治癒とした。

経口投与による実験は次のように行った。

上記と同様に腫瘍を移植し、投与群には移植当日より各濃度に調整した試料溶液を給水ビンを用いて自由に飲水させた。移植後 21 日目に腫瘍サイズ(長径 mm×短径 mm)を計測した。対照群には同様の操作で水のみを飲水させた。投与群と対照群の腫瘍サイズを比較し、投与効果を評価した。なお、飲水量は自由飲水であっても、両群とも結果的には約 5.0 ml/day であった。

繊維芽肉腫 Meth-A 細胞に対する増殖抑制評価

BALB/c マウス由来繊維芽肉腫 Meth-A 細胞(Meth-A fibrosarcoma, RCB 0464)は理化学研究所より購入した。10% 仔牛胎児血清 (FBS, Flow Lab.) を 56°C, 30 min の条件下で非動化させ、添加した RPMI 1640 培地 (7.5% Sodium bicarbonate 29.3 ml, 100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin 含有はいずれも GIBCO BRL より購入) で 37°C, 5% CO_2 存在下にて培養した。Dulbecco のリン酸緩衝液 PBS (phosphate-buffered saline pH 7.4) は、NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g を超純水で 1.0 l に定容し、滅菌したものを使用した。細胞増殖の測定のために用いたトリパンプルーは GIBCO BRL より購入した。また、WST-1 アッセイキットは同仁化学研究所より購入した。発色試薬は以下のように調製した。1-MethoxyPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate) を 7.0 mg 秤取し、10 ml の超純水に溶解したものを A 液として、16.5 mg の WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] を 4.5 ml の PBS に溶かしたものを B 液とした。A 液 0.5 ml, B 液 4.5 ml を混合し、0.22 μl メンブランフィルターでろ過滅菌したものを使用した。

繊維芽肉腫 Meth-A 細胞の培養は次のように行った。

組織培養用の 25 ml フラスコに 5×10^4 cells/ml (10% FBS 含有 RPMI 1640 培地) に調整した Meth-A 細胞を 10 ml 入れ、5% CO_2 , 37°C で培養した。細胞を含んだ RPMI 1640 培地を遠心分離(1,000 rpm, 5 min)し、上澄みを捨てた後、回収した細胞に新しい RPMI 1640 培地 5 ml を加え、Improved Neubauer 血球計算板で細胞数を測定後、RPMI 1640 培地を用いて 5×10^4 cells/ml に調整することにより継代を行った。また、4 日間ごとに継代培養を繰り返した。

色素排除法による生細胞数の測定は次のように行った。

Meth-A 細胞を 10% FBS 含有 RPMI 1640 培地に 5×10^4 cells/ml となるように調整し、12 穴プレートに 360 μl ずつ蒔いて 24 h 前培養した。その後、熱水抽出物溶液を所定の終濃度になるように 40 μl 添加した。5% CO_2 , 37°C のイン

キュベーターで培養を行い、24 h 毎に生細胞数を測定した。その際トリパンブルー溶液で染まったものを死細胞とし、Improved Neubauer 血球計算板を用いて全細胞数から死細胞数を差し引いた細胞数を生細胞数として算出した。

WST-1 アッセイは WST-1 が細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の基質となることを応用したもので、細胞が WST-1 を還元した結果生じるホルマゼン量が生細胞数と対応することに基いている。WST-1 アッセイキットを用いることにより WST-1 を発色させ、マイクロプレートリーダー (Emax precision microplate reader, Molecular Devices) で、その吸光値 (波長 450 nm, 参照波長 650 nm) を測定することより生細胞数を算出した。尚、継代培養を行ってから 48 h の Meth-A 細胞を用い、 5×10^4 cells/ml に調整した細胞培養液 100 μ l を 96 穴プレートに蒔いた。所定濃度の熱水抽出物溶液を 10 μ l 添加し、46, 70 h 後に WST-1 試薬を 10 μ l 加えて、2 h 後の発色をマイクロプレートリーダーで測定した。生細胞率の算出は下記によった。

$$\text{生細胞率 (\%)} = (C - B) / (A - B)$$

A: 吸光値 (試料無添加)

B: 培地のみの吸光値

C: 吸光値 (試料添加)

アポトーシス誘導能の測定

アポトーシスの誘導能の測定には、ヒストンと DNA に対してそれぞれ特異性を持つマウスモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫法 (サンドイッチ ELISA) を使用した Cell Death Detection ELISA^{PLUS} キットを用い、その添付取扱説明書の方法に従って行った。すなわち Meth-A 細胞を培養後、遠心分離 (100×g, 5 min) により培地を除去、細胞を回収した後、200 μ l の lysis buffer を加え、室温で 30 min、プレートシェイカー上でインキュベートすることにより細胞溶解液を得た。これを 100×g, 10 min 遠心分離した後、上清 20 μ l をストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレートに移した。各ウェルに予め作成しておいたイムノミックス (ペルオキシダーゼ標識抗 DNA 抗体溶液: ビオチン標識抗ヒストン抗体溶液: インキュベーションバッファー=1:1:18 (v/v/v)) を 80 μ l 加えて、室温で 2 h プレートシェイカーを用いてゆっくり振盪しながら遮光下で反応させ、反応終了後、プレートをペーパータオルの上に逆さにして、ウェル内の溶液を除去し、インキュベーションバッファーで 3 回洗浄した。基質溶液として ABTS (2, 2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonate]) 溶液を 100 μ l 加え、プレートシェイカーを用いて 250 rpm で 15 min 発色反応させた。次いで各ウェルの溶液を 100 μ l ずつ 96 穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp.) を用いて 405 nm の吸光値 (参照波長: 490 nm) を測定した。これをもとに以下の計算式によりモノ、オリゴヌクレオソームのエンリッチメントファクターを算出、アポトー

シス誘導能の指標とした。

分子量分布の測定

硫酸化多糖の平均分子量を明らかにするため、デキストランの分画可能範囲が $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ である Sepharose CL-4B (2.5×85 cm) に試料を 10 mg/0.5 ml 供して、pH 7.0 の 20 mM Tris-HCl (0.2 N NaCl) 緩衝液で流速 30 ml/h にてゲル濾過を行った。検出はフェノール硫酸法によった。分子量の標準物質には Shodex STANDARD P-82 (P-800: 78.8×10^4 , P-400: 40.4×10^4 , P-200: 21.2×10^4 , P-100: 11.2×10^4 , P-50: 4.73×10^4) を用いた。

結果及び考察

供試アカモクの一般成分組成

富山県で採取したアカモクは乾物重量あたりタンパク質含量が 17.4%, 全脂質が 3.7%, 灰分が 25.2% であり、北海道江差で採取したものは、タンパク質含量が 14.1%, 脂質が 1.3%, 灰分が 23.3% であった。一般的に食用とされている海藻の中では比較的タンパク質含量が多かった。海藻の成分は季節や採取場所による変動が大きいと言われているが、脂質含量以外両者に大きな差異は見られなかった。湿藻体のうち約 90% は水分であった。

次にアカモクのトリプトファンを除くタンパク質構成アミノ酸含量について調べた (Table 1)。タンパク質 (g) あたりの含量を算出したところ、地域間に特に大きな差異は認められなかった。アスパラギン酸は富山のもので 96.8

Table 1 Amino Acid Composition of Dried *Sargassum horneri* Collected in Toyama Prefecture and Esashi, Hokkaido

	mg/g protein of <i>S. horneri</i>	
	Toyama	Esashi
Ile	48.7	50.1
Leu	80.9	88.2
Lys	47.7	46.0
Met	22.7	28.2
Cys	38.5	21.0
Phe	48.4	58.8
Tyr	34.9	26.3
Thr	45.6	53.1
Val	56.6	72.6
His	15.5	16.1
Arg	57.6	57.3
Ala	58.3	72.2
Asp	96.8	111.4
Glu	112.0	131.9
Gly	54.0	63.0
Pro	46.5	49.7
Ser	43.9	49.2

mg, 北海道のもので 111.4 mg, グルタミン酸はそれぞれ 112.0 mg, 131.9 mg と多く含まれていたが, 他の海藻と比べて特に多いと認められるアミノ酸はなかった。その組成は同じ褐藻であるワカメ (科学技術庁資源調査書編日本食品アミノ酸組成表, 1986) とよく類似していた。

脂質組成分析の結果 (Table 2), 単純脂質にはトリアシルグリセロール (TAG) 及びモノとジアシルグリセロール (MAG, DAG) の他, 多量のステロールが検出された。褐藻のステロール含量は乾燥重量に対して多いもので 0.2%, 少ないもので 0.02% 程度とされており, 当該アカモクの分析結果では乾燥重量に対して 0.3% と高い値を示していた。しかし, TLC プレート上のステロールのスポット付近にテーリングが見られていたため, 過大値に測定された可能性も考えられる。正確な含量の把握には更なる検討が必要である。複合脂質ではモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG), ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG), スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) が多量に含まれており, それらの量比は約 1:2:4 であった。また褐藻の複合脂質は大部分がグリセロ糖脂質で, 他にスフィンゴ脂質やリン脂質が存在するということが知られているが, それらは殆ど含まれていなかった。

褐藻の光合成色素はクロロフィル a, c と補助色素フコキサンチンなどである。また, 光合成産物の主要なものは多糖類のラミナランとマンニトールで, 細胞間多糖としてアルギン酸と硫酸化多糖を含んでおり, 細胞壁の骨格多糖はセルロースであるということが知られている。そこで褐藻アカモクの特徴を示す成分であると考えられる水溶性多糖のアルギン酸と硫酸化多糖及びラミナラン, 補助色素のフコキサンチンの定量を行い, 産地間の比較を行った。水溶性多糖について見ると, 富山県のものでは北海道のものよ

りもアルギン酸が多く, 硫酸化多糖が少ないということがわかった。しかし, これらの定量法は簡易的なものであるため, 多糖類間の混入や, それぞれの抽出多糖に薄い褐色が認められたことから, 色素成分の混入も考えられる。また, 藻体残渣に粘性が残っており, 定量的に抽出されていないことに加えて各多糖類の高次構造の違いによる抽出効率に違いが見られる可能性もある。よって, 正確な含量を把握することは困難であった。富山県で冬に採取された食用に用いられている未成熟のアカモクに比べ北海道の春に採取されたものは成熟の段階が進んでおり, 光合成などの代謝活動が少ないことが予想されるため, 北海道のものはラミナラン含量が少なかったと考えることもできる。フコキサンチンは富山のものが北海道のものに比べ 2 倍近く多かった。

熱水抽出物の組成

熱水抽出物の一般成分分析を行った結果, 3.6% のタンパク質に加え, 透析を行ったにもかかわらず 16.8% もの灰分が含まれていた。

熱水抽出により得られた水溶性多糖の構成単糖の定性分析を行ったところ (Fig. 1), アルギン酸由来であると推察される GlcUA, フコイダンに代表される硫酸化多糖に由来すると考えられるフコース (Fuc) やガラクトース (Gal), さらにラミナランに由来すると思われるグルコース (Glc) などの存在が認められた。しかし, 光合成産物であるマンノース (Man) の存在は確認されず, 透析により除かれたものと考えられる。これら単糖を定量したところ, Fuc, Glc, Gal の量はそれぞれ 1.9%, 0.8%, 0.8% となっていた。また, GlcUA を含むウロン酸の量は 6.2%, 硫酸基の量は 3.6% であった。しかし, 熱水抽出物には強い着色が見られ, 定性分析を行ったところテーリングも見られたため, 色素成分など多くの不純物の混入が考えられた。

Table 2 Lipid Composition of *Sargassum horneri*

	% in Total lipid	
	Toyama	Esashi
Simple lipid	41.6	47.8
Complex lipid	57.9	51.4
	% in Simple lipid	
	Toyama	Esashi
MAG	11.5	10.8
DAG	22.8	25.3
TAG	28.3	28.9
Sterol	29.1	23.1
Others	8.3	11.9
	% in Complex lipid	
	Toyama	Esashi
SQDG	36.8	10.8
DGDG	21.3	37.8
MGDG	19.1	21.1
Chlorophyll	13.5	22.4
Others	6.3	7.9

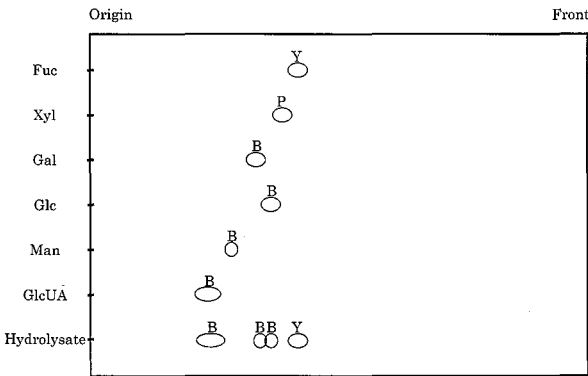


Fig. 1. Thin layer chromatogram of hydrolysate of hot water extracts.
Developing solvent : *n*-buthanol : acetic acid : water = 2:2:1 (v/v/v).
○ : Visualized with phenol-sulfuric acid
Abbreviations of spot colors designated as follows :
Y : yellow, P : purple, B : brown

熱水抽出物にはアルギン酸が26.8%, ラミナランが19.2%, 硫酸化多糖が40.4%含まれていた。また, エタノール抽出物にはフコキサンチンが2.6%含まれていた。湿藻体から直接アルギン酸, ラミナラン, 硫酸化多糖を抽出したところ, 湿藻体あたりそれぞれ1.5%, 0.1%, 0.2%しか抽出されなかった。一方, 乾燥藻体からの熱水抽出物の収量は9.6%になった。しかし, 湿藻体の約90%が水分なので, 熱水抽出の抽出効率は乾燥藻体から抽出したものと, 湿藻体から抽出したものとは大きく異なることがわかった。何れにしても抽出残渣に粘性が残っていたことから, 数回程度の抽出操作では多糖類の抽出が不十分になることは否めなかった。また得られた各単糖の強い褐色の着色が見られたことから考えて, 熱水抽出物には尚多くの不純物を含んでいることも推察された。

動物実験による抗腫瘍性評価

アカモクの熱水抽出物及びエタノール抽出物の局所投与における抗腫瘍活性について調べたところ, 熱水抽出成分に期待できる抗腫瘍活性を認めた (Fig. 2)。腫瘍サイズは対照群で $381.3 \pm 217.3 \text{ mm}^2$ であったのに対し, 熱水抽出物を $1.0 \text{ mg} \times 3$ 投与した群では腫瘍を治癒させることはできなかったが, 腫瘍サイズを対照群の54% ($204.8 \pm 91.7 \text{ mm}^2$) にまで減少させることができた。しかし, エタノール抽出物を投与した群では腫瘍サイズが $405.4 \pm 140.3 \text{ mm}^2$ になってしまい, 抗腫瘍性は認められなかった。

熱水抽出物の局所投与量を少なくして調べたところ0.1

$\text{mg} \times 3$, $0.5 \text{ mg} \times 3$ の濃度で腫瘍の完全治癒に達した個体を確認した。特に $0.1 \text{ mg} \times 3$ の投与で4/5のマウスにおいて腫瘍が治癒した (Fig. 3)。これらの結果から, むしろ投与量の少ない場合に熱水抽出物の効果が表れやすいことが判明した。

局所投与よりも経口投与によって抗腫瘍活性を誘導できればアカモクの利用拡大が一層期待できる。そこで経口投与による抗腫瘍活性について調べた結果, 経口投与によっても抗腫瘍活性がみられることがわかった (Fig. 4)。濃度は $0.01 \sim 0.05\%$ の範囲で有効であり, 特に 0.05% の濃度で自由に飲水させたときに3/5のマウスにおいて腫瘍の治癒がみられた。マウスの飲水量はおよそ 5.0 ml/匹/day であり, これを基に計算すると1日におよそ 2.5 mg 摂取したことになる。今後, 応用, 実用化を図るには慢性・急性毒性試験による安全性の確認が必要であるが, アカモクより抽出した熱水抽出物には局所, 経口投与共に抗腫瘍活性が確認された。

これまでキノコや海藻などから熱水で抽出された多糖の抗腫瘍活性については多くの報告 (Carbonnelle et al., 1999; Itoh et al., 1993) がある。しかし, 局所的に投与したものと, 経口投与したものの作用機序は熱水抽出物に含まれる多糖類が消化吸収されない繊維質であるため, 全く異なるものであると考えられる。局所投与したものではナチュラルキラー細胞活性化などによる免疫賦活作用 (Coombe, 1987), 転移抑制作用や血管新生抑制作用による

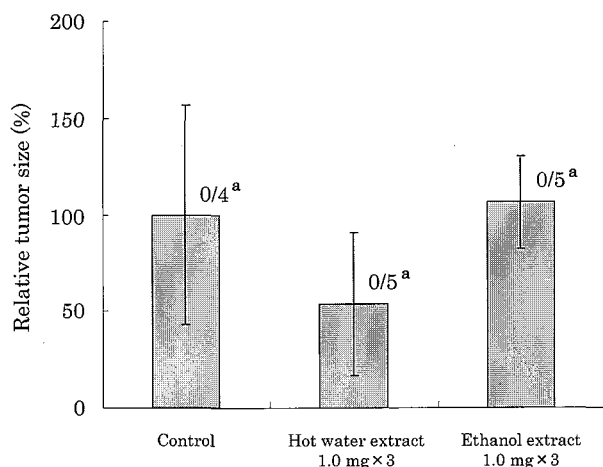


Fig. 2. Antitumor effect of hot water extract and ethanol extract administered by intraperitoneal injection on Meth-A fibrosarcoma-bearing BALB/c mice.

Female BALB/c mice were used. Tumor cells (5.0×10^6 cells/mouse) suspended in PBS were implanted intraperitoneally into the mice. The extracts were injected intraperitoneally at dose of 1.0 mg/mouse three times on days 2, 4, and 6 after tumor implantation. Mice receiving similar treatment with PBS alone served as a control. The mice were observed for 21 days. Tumor size of those mice were measured on day 21.

a: Tumor-free mice/Total mice

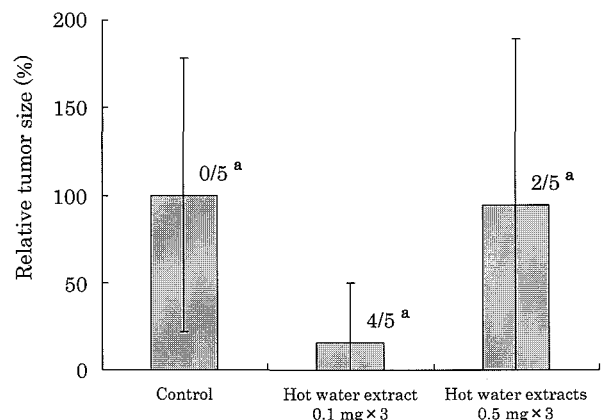


Fig. 3. Antitumor effect of hot water extract administered by intraperitoneal injection on Meth-A fibrosarcoma-bearing BALB/c mice.

Female BALB/c mice were used. Tumor cells (5.0×10^6 cells/mouse) suspended in PBS were implanted intraperitoneally into the mice. The hot water extract was injected intraperitoneally at doses of 0.1 or 0.5 mg/mouse three times on days 2, 4, and 6 after tumor implantation. Mice receiving similar treatment with PBS alone served as a control. The mice were observed for 21 days. Tumor size of those mice were measured on day 21. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=5$)

a: Tumor-free mice/Total mice

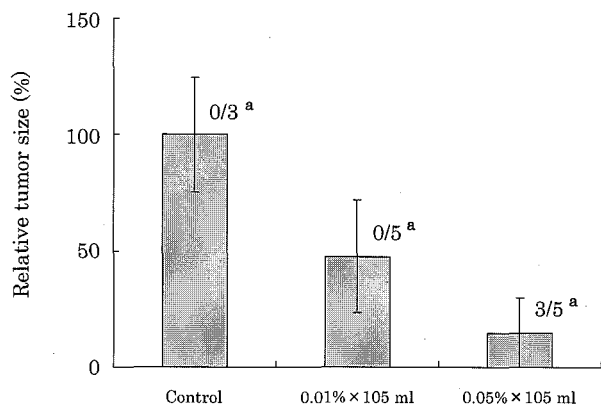


Fig. 4. Antitumor effect of hot water extract administrated orally on Meth-A fibrosarcoma-bearing BALB/c mice. Female BALB/c mice were used. Tumor cells (5.0×10^6 cells/mouse) suspended in PBS were implanted intraperitoneally into the mice. The hot water extract water solution was administrated orally after tumor implantation *ad libitum*. Mice receiving similar treatment with water alone served as controls. The mice were observed for 21 days. Tumor size of those mice were measured on day 21.

a: Tumor-free mice/Total mice

ものと考えられている。一方、経口投与による作用機序としては一般に腸管免疫系の刺激による免疫賦活や、腸内細菌叢の改善によるものであると推察されている。特に腸管は絶えず膨大な種類と量の細菌やウイルス、植物性タンパク質などにさらされているため、生理的活動を営む上で非常に過酷な生活環境に置かれており、堅固なバリア機構をそなえている。腸管には全リンパ球の60~70%が存在しており、腸管関連リンパ組織 (GALT) と呼ばれる免疫機構があり、独自の機能を発達させている。その機能は小腸などに点在するパイエル板と呼ばれるリンパ組織のM細胞を介して取り込まれた異物を濾胞域において樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に貪食、提示が行われ、T細胞やB細胞などの免疫細胞を刺激することで開始される。また、腸管上皮細胞に4~6個に1つの割合で存在する腸上皮間リンパ球自体が免疫シグナルを発する免疫機能を持っていることが知られるようになり、アカモクにおいてもこれら免疫機構を活性化することに伴い抗腫瘍効果を持つという作用機序が推察されるが、明確なことは何もわかっておらず、今後の研究が待たれる。

キノコ類などから抽出された抗腫瘍活性をもつ水溶性多糖類が免疫賦活などの間接的な作用機序によるものであるのに比べ、褐藻のコンブ類にはアポトーシス誘導など腫瘍細胞に直接の影響を及ぼす成分の存在が考えられる。先に述べたように、熱水抽出した成分には多くの不純物が存在していたことから、局所投与において強い抗腫瘍活性が見られた一因に、腫瘍細胞に直接抗腫瘍作用を及ぼしている成分の存在が推察された。そこで次に、熱水抽出物が直接腫瘍細胞に及ぼす影響について調べた。

Meth-A 細胞に対する熱水抽出物の増殖抑制効果

Meth-A 細胞に対する熱水抽出物の増殖抑制効果について色素排除法を用いて24 h毎にその細胞数の経時的変化を調べた結果 (Fig. 5), 5.0 mg/ml以上の熱水抽出物の添加でMeth-A細胞の増殖を濃度依存的、経時的に抑制した。特に72 hでは20 mg/ml以上の濃度で強い増殖抑制作用が見られた。また、縮小していたものや、破裂していたもの、肥大していたものなど様々な形状の細胞が観察された。さらに、増殖抑制効果の見られた48, 72 h後における細胞残存率の濃度依存性をWST-1アッセイ法によって調べた結果 (Fig. 6), それぞれの濃度におけるそれぞれの細胞残存率は48 h後で85.4, 69.8, 51.1, 42.5, 27.1, 13.0%であり、72 h後では83.2, 52.0, 43.9, 36.1, 16.0, 2.5%であった。すなわち色素排除法と同様、濃度依存的、経時的な細胞毒性を示した。

先の動物実験では1個体あたり 5.0×10^6 個以上の腫瘍細胞に対し、0.1 mg/mlの熱水抽出物を1.0 ml×3回投与 (0.3 mg) することによって強い抗腫瘍活性が見られた。これに対し、細胞に直接添加した場合にはウェルあたり 2.0×10^4 個の細胞に対し熱水抽出物を2.0 mg (5.0 mg/ml×0.4 ml)以上添加しないと強い増殖抑制効果が見られなかった。動物実験では生体内の腫瘍細胞の状態や細胞数が大きく異なるため、一概に比較することは困難であるが、細胞に直接与える熱水抽出物の影響は予想以上に弱かった。このため熱水抽出物が示す抗腫瘍活性は細胞に与える直接的

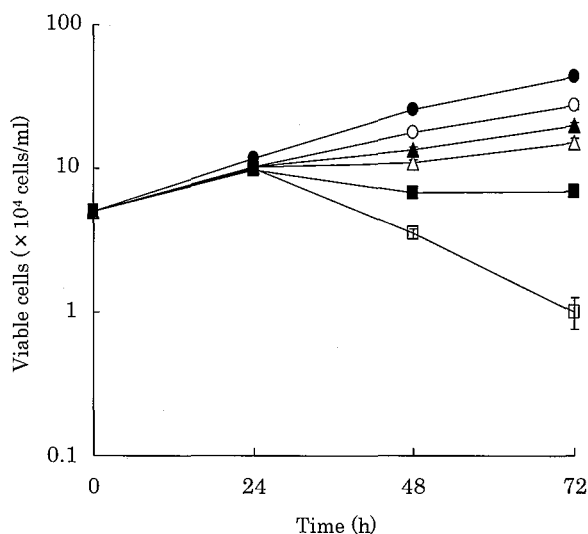


Fig. 5. Time course of viability of Meth-A fibrosarcoma cells treated with the hot water extracts.

Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, hot water extract was added to the culture medium and incubated for 72 h. Viable cell number was determined by trypan blue dye exclusion method. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=3$)

—●— Control —○— 5.0 mg/ml —▲— 10.0 mg/ml
—△— 15.0 mg/ml —■— 20.0 mg/ml
—□— 25.0 mg/ml

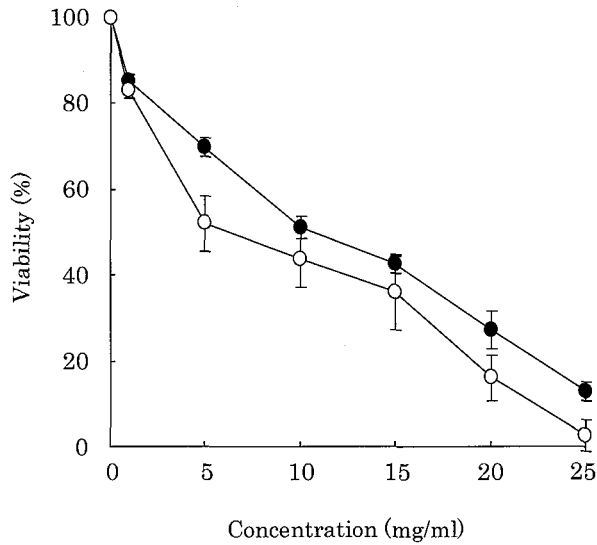


Fig. 6. Dose-response of viability of Meth-A fibrosarcoma cells treated with the hot water extracts. Meth-A fibrosarcoma cells were seeded in a 96-well plate with 100 μ l growth medium to give 5.0×10^4 cells. Then, hot water extract was added. Cell viability was determined every 24 h following the WST-1 dye reduction assay with slight modification. The medium was not removed, and the cells were cultured for another 48–72 h in the medium (100 μ l). WST-1 (3.3 mg/ml PBS included 7% 1-methoxy PMS) was added to each well (10 μ l/100 μ l medium), and the plate was incubated at 37°C for 3 h. Absorbance at 450/650 nm was measured for each well on a Microplate reader. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=6$)

な影響のみに依存するのではなく、生体内での免疫賦活作用によることが強く示唆された。しかし、熱水抽出物が繊維芽肉腫 Meth-A 細胞の増殖を直接抑制することには変わらないので、次にその成分の同定を試みた。

熱水抽出物中の Meth-A 細胞に対する抗腫瘍活性成分

熱水抽出物より分画を行った各多糖の Meth-A 生細胞数への影響について色素排除法を用いて検討した (Fig. 7 ~9)。24 h 毎に生細胞数を調べた結果、アルギン酸、ラミナランの画分ではコントロールと変わらなかったが、硫酸化多糖の画分では Meth-A 細胞の増殖を濃度依存的、経時的に強く抑制していた。また 72 h では 5.0 mg/ml 以上の濃度で強い細胞毒性が見られ、細胞の形状を観察したところ、24 h 後から縮小している細胞が観察された。さらに増殖抑制効果の見られた 48, 72 h 後の細胞生残率に対する濃度依存性を WST-1 アッセイ法によって調べた結果 (Fig. 10)、各濃度におけるそれぞれの細胞生残率は 48 h 後で 98.4, 87.1, 75.9, 61.7, 32.4%, 72 h 後では 73.5, 64.7, 58.2, 31.9, 2.6% であった。色素排除法と同様、濃度依存的、経時的な細胞毒性が認められた。

以上のことから、熱水抽出物の抗腫瘍性は主に硫酸化多糖に依存するものであると考えられる。しかし、熱水抽出

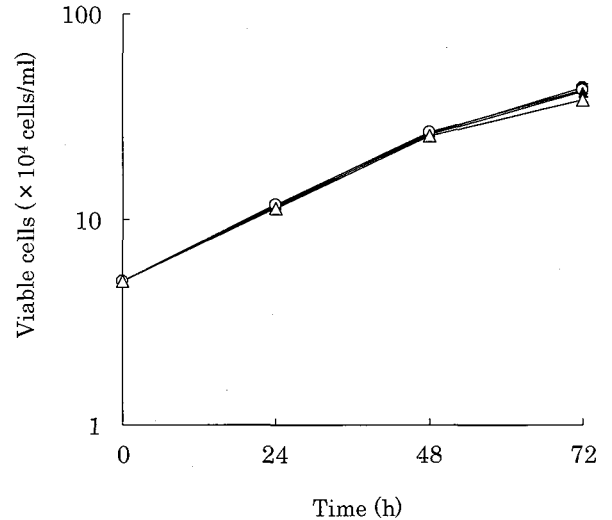


Fig. 7. Effect of alginates on viability of Meth-A fibrosarcoma cells. Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, alginates were added to the culture medium and incubated for 72 h. Viable cell number was determined by trypan blue dye exclusion method. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=3$)

● Control ○ 5.0 mg/ml ▲ 15.0 mg/ml △ 25.0 mg/ml

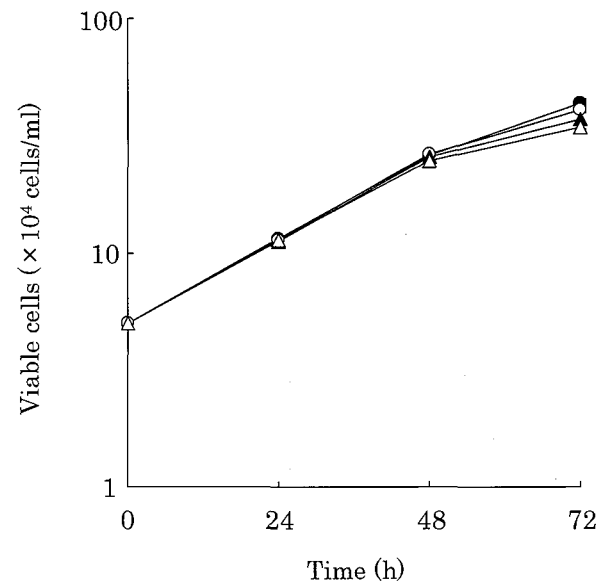


Fig. 8. Effect of laminaran on viability of Meth-A fibrosarcoma cells. Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, laminaran were added to the culture medium and incubated for 72 h.

● Control ○ 5.0 mg/ml ▲ 15.0 mg/ml △ 25.0 mg/ml

物中に硫酸化多糖がおおよそ 40% 含まれていること (Table 3) を考慮すると、傾向として硫酸化多糖の方が熱水抽出物よりも低い活性を示したように見える (Fig. 5, Fig. 9 または Fig. 6, Fig. 10)。これらの原因として、熱水抽出物に含

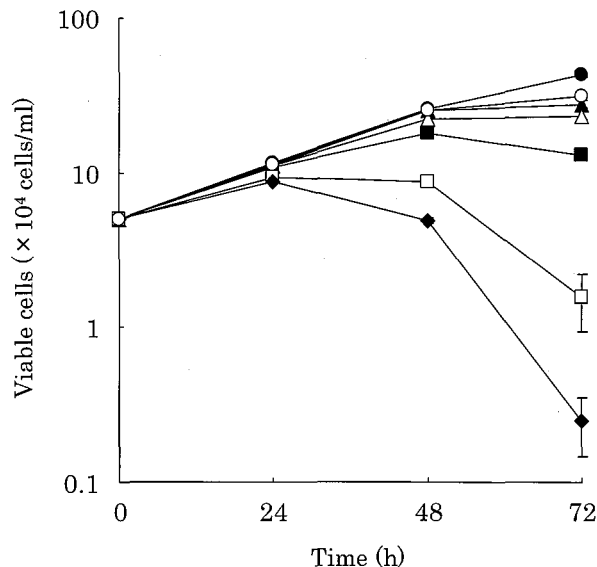


Fig. 9. Effect of sulfated polysaccharide on viability of Meth-A fibrosarcoma cells.

Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, sulfated polysaccharides were added to the culture medium and incubated for 72 h. Viable cell number was determined by trypan blue dye exclusion method. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=3$)

—●— Control —○— 1.0 mg/ml —▲— 2.0 mg/ml
—△— 3.0 mg/ml —■— 4.0 mg/ml
—□— 25.0 mg/ml —◆— 25.0 mg/ml

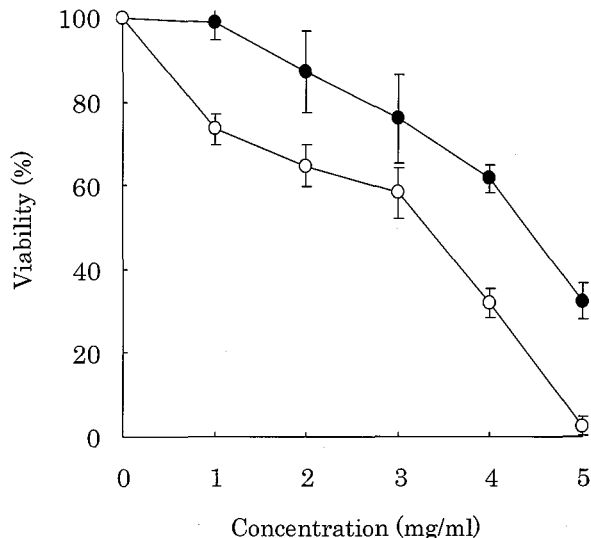


Fig. 10. Dose-response of viability of Meth-A fibrosarcoma cells treated with the sulfated polysaccharide.

Meth-A fibrosarcoma cells were seeded in a 96-well plate with 100 μ l growth medium to give 5.0×10^4 cells. Then, sulfated polysaccharide was added. Cell viability was determined every 24 h following the WST-1 dye reduction assay with slight modification. The medium was not removed, and the cells were cultured for 48–72 h in the medium (100 μ l). WST-1 (3.3 mg/ml PBS included 7% 1-methoxy PMS) was added to each well (10 μ l/100 μ l medium), and the plate was incubated at 37°C for 3 h. Absorbance at 450/650 nm was measured for each well on a Microplate reader. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=6$)

—●— 48 h —○— 72 h

Table 3 Polysaccharide amount in hot water extract and fucoxanthin amount in ethanol extract

	% in hot water extract	% in ethanol extract
Alginate	26.8	
Laminaran	19.2	
Sulfated polysaccharide	40.4	
Fucoxanthin		2.6

まれる細胞毒性を持つとされる微量元素や色素成分といった不純物の存在が考えられた。そこで先ずこれら微量元素の影響の有無を確認するため、熱水抽出物及び硫酸化多糖を灰化し、得られた灰化物をそれぞれ 4.2 (25.0×0.168) mg/ml, 1.2 (5.0×0.257) mg/ml ずつ添加して Meth-A 細胞に対する影響を調べた。これら微量元素はイオン亢進による膜破壊を伴う細胞毒性の影響が懸念されたが、これら灰化物は Meth-A 細胞に影響を与えなかったため、微量元素物質の影響はないものと考えられた。一方で、熱水抽出物と硫酸化多糖には着色の程度に差異が認められたため、細胞毒性を持つと言われているタンニン類等フェノール性化合物の含量に差がある可能性が示唆された。しかし、これらフェノール性化合物と多糖類の分離、またそれら成分の定量方法は未だ確立されておらず、帰属は困難である。そのため熱水抽出物、硫酸化多糖中に含まれる着色性物質の及ぼす影響と、硫酸化多糖そのものの及ぼす影響を比較することは困難であると考えられた。従って、硫酸化多糖の方が熱水抽出物より低い活性を示したように見えるのはタンニン類等フェノール性化合物含量の差異によるものと考えられたが、断言には至らなかった。

Meth-A 細胞の増殖に与える硫酸化多糖の影響

硫酸化多糖のスタンダードとして用いられている同じ褐藻 (*F. vesiculosus*) 由来のフコイダンとアカモク由来の硫

酸化多糖の抗腫瘍性の比較を行った (Fig. 11)。色素排除法により 24 時間おきに Meth-A 生細胞数を調べた結果、*F. vesiculosus* 由来のフコイダンは Meth-A 細胞の増殖を濃度依存的、経時的に強く抑制した。特に 72 h では 5.0 mg/ml 以上の濃度で Meth-A 細胞に対し強い細胞毒性効果が見られた。また、細胞を観察したところ形状に違いが見られ、アカモク由来硫酸化多糖と比べて肥大していたり、破裂している細胞が多く観察された。さらに、増殖抑制効果の見られた 48, 72 h 後の 1.0–5.0 mg/ml 添加におけるそれぞれの細胞残存率を WST-1 アッセイ法によって調べた結果 (Fig. 12, 13), それぞれの濃度においてアカモク由来硫酸化多糖と *F. vesiculosus* 由来フコイダンの抗腫瘍効果はほぼ

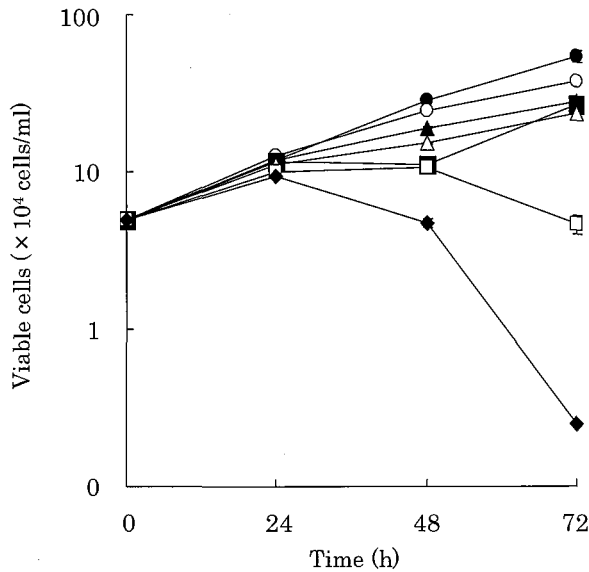


Fig. 11. Effect of sulfated polysaccharide from *Fucus vesiculosus* on viability of Meth-A fibrosarcoma cells. Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, sulfated polysaccharide was added to the culture medium and incubated for another 72 h. Viable cell number was determined by the trypan blue dye exclusion method. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=3$)

—●— Control —○— 1.0 mg/ml —▲— 2.0 mg/ml
—△— 3.0 mg/ml —■— 4.0 mg/ml
—□— 25.0 mg/ml —◆— 25.0 mg/ml

同等であることを認めた。また、色素排除法による評価と同様、濃度依存的、経時的な細胞毒性を示していた。一般に硫酸化多糖の生物活性は由来の違いや抽出方法、さらには多糖の高次構造により大きく異なるとされているが、同程度の細胞増殖抑制を示した点は非常に興味深い。

アポトーシスはプログラムされた細胞死である。特にガン細胞は無秩序に増殖するという特徴があるため、アポトーシスの機能を回復させることはガンの予防や治療法として有効であると考えられている。今回用いた Cell Death Detection ELISA^{PLUS} キットはアポトーシスによって断片化した核 (モノ-オリゴヌクレオソーム) を定量するもので、Enrichment factor (E. factor) が上昇すればより多くの細胞がアポトーシス誘導を受けているものと判断できる。熱水抽出物と硫酸化多糖により誘導され、断片化した核を定量したところ、コントロールに比べ E. factor が上昇していたが、Meth-A 細胞の増殖に影響を与えなかったアルギン酸ではほとんど上昇していなかった。熱水抽出物では特に 25 mg/ml の投与、24 h の処理で E. factor が 6.6、硫酸化多糖では 5 mg/ml の投与、24 h の処理で E. factor が 12.1 まで上昇していた。このように 24 h 処理した際に高い E. factor を示してはいたが、細胞の増殖に大きな影響を与えたのは 48 h 以降であった。これはアポトーシスが誘導された後、細胞は静止期 (G_0 期) を 6~12 h 経過すると言われており、熱水抽出物や硫酸化多糖により Meth-A 細胞が

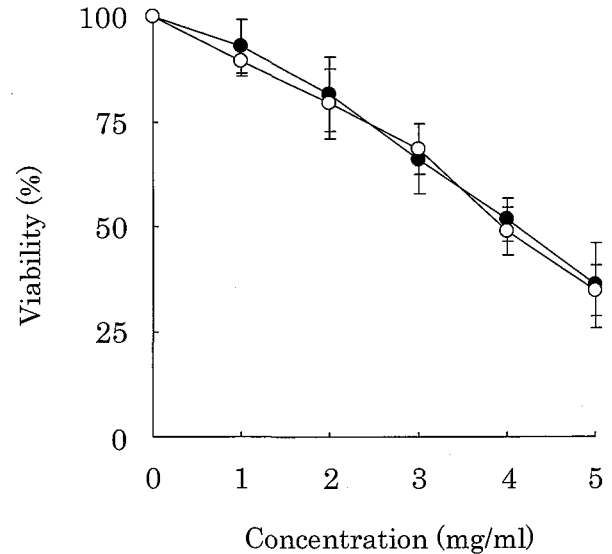


Fig. 12. Comparison of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* and *Fucus vesiculosus* on viability of Meth-A fibrosarcoma cells for 48 h.

Meth-A fibrosarcoma cells were seeded in a 96-well plate with 100 μ l growth medium to give 5.0×10^4 cells. Then, sulfated polysaccharide was added. Cell viability was determined following the WST-1 dye reduction assay with slight modification. The medium was not removed, and the cells were cultured for another 48 h in the medium (100 μ l). WST-1 (3.3 mg/ml PBS included 7% 1-methoxy PMS) was added to each well (10 μ l/100 μ l medium), and the plate was incubated at 37°C for 3 h. Absorbance at 450/650 nm was measured for each well on a Microplate reader. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=6$)

—●— *Fucus vesiculosus* —○— *Sargassum horneri*

G_0 期に誘導されたためではないかと考えられる。

以上のように、アカモクの熱水抽出物が示した抗腫瘍性の作用機序の一端としてアポトーシス誘導能が認められた (Chen et al., 2004; Ishiwatari, et al., 1997)。

アカモク硫酸化多糖の単糖

エタノールにより色素成分を除去した後、抽出して得られた硫酸化多糖の収率はアカモク乾燥藻体に対して 8.6% であった。硫酸化多糖の構成単糖の定性分析を行った結果、構成単糖として Fuc, Gal, GlcUA の存在が確認されたが、Man は検出されなかった。さらにこれらの定量を行った結果、Fuc, Gal, と GlcUA を含む UA はそれぞれ 22.1, 10.0, 9.8% 含まれていた。さらに硫酸基の含量を含むこれらのモル比は Fuc:Gal:UA:SO₄=1:0.42:0.37:1.4 となっていた。本硫酸化多糖は UA 含量が多く、特徴的であることが判明した。

Meth-A 細胞の増殖に与える硫酸化多糖の分子量と硫酸基の影響

硫酸化多糖はタンパク質に吸着することで生物活性を

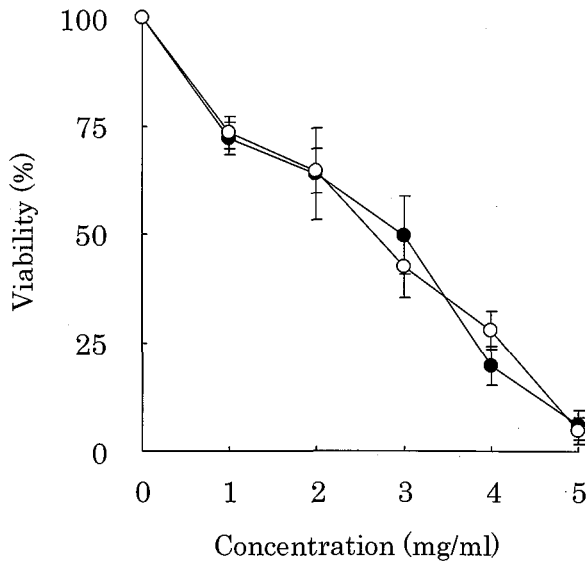


Fig. 13. Comparison of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* and *Fucus vesiculosus* on viability of Meth-A fibrosarcoma cells after 72 h incubation. Meth-A fibrosarcoma cells were seeded in a 96-well plate with 100 μ l growth medium to give 5.0×10^4 cells. Then, sulfated polysaccharide were added. Cell viability was determined following the WST-1 dye reduction assay with slight modification. The medium was not removed, and the cells were cultured for another 72 h in the medium (100 μ l). WST-1 (3.3 mg/ml PBS included 7% 1-methoxy PMS) was added to each well (10 μ l/100 μ l medium), and the plate was incubated at 37°C for 3 h. Absorbance at 450/650 nm was measured for each well on a Microplate reader. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=6$)

● *Fucus vesiculosus* ○ *Sargassum horneri*

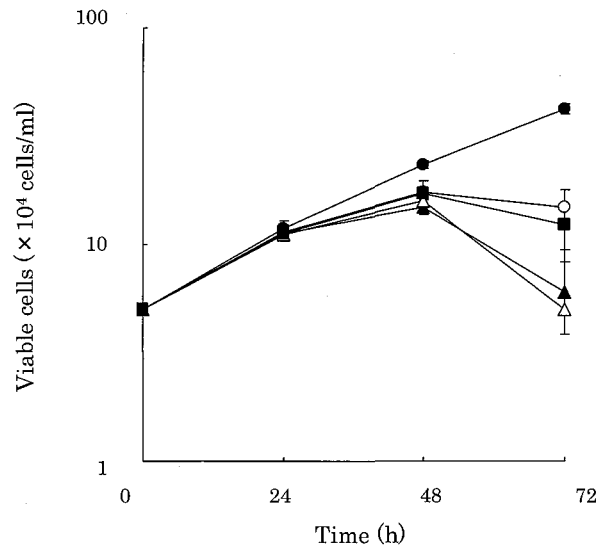


Fig. 14. Effect of S1, S2, S3 and S4 on viability of Meth-A fibrosarcoma cells.

Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, S1, S2, S3 and S4 were added to the culture medium and incubated for another 72 h. Viable cell number was determined by the trypan blue dye exclusion method. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=3$)

● Control ○ S1 ▲ S2 △ S3
■ S4

Table 4 Mean Molecular Weight of Fractions S1, S2, S3 and S4

	Mean Mw	Yield (%)	Sulfate (%)
S1	1000000	3.5	15.9
S2	300000	32.6	20.8
S3	110000	39.6	21.4
S4	50000	12.3	17.5

発揮すると推察されている。また、一般に低分子化したものは高分子のものに比べて活性が低いともいわれている。さらに、由来や抽出方法、分画方法により単糖の組成や硫酸基の組成が大きく変わることも知られている。これらは硫酸化多糖に様々な分子種が存在するためであると考えられる。よって、分画を行い活性と分子種の間関係を明らかにすることは非常に重要である。一般に糖質は酸により加水分解を受け、低分子化する。今回用いた抽出方法は希塩酸により抽出を行ったため、硫酸化多糖が分解を受けて低分子化したことや、高次構造の崩壊が懸念された。また、CPCの沈殿で得られる多糖は多様な分子種を含む硫酸化多糖であることが考えられる。そこでゲル濾過を行った硫酸化多糖を分子量別に分画したもの (Table 4) を 5.0 mg/ml ずつ Meth-A 細胞に添加し、細胞増殖に与える影響を調べた (Fig. 14)。その結果、画分 S2 と S3 で Meth-A 細胞の増殖を抑制したが、画分 S1 と S4 では抑制力が弱かった。S2, S3 の画分の活性は分画を行っていない硫酸化多糖を 5.0 mg/ml 添加したときとほぼ同等の効果を示していたことから、硫酸化多糖の活性はこの画分に依存するものではないかと推察された。Table 4 より S2 及び S3 のように硫酸基含量

の多い画分が高い活性を示すという傾向が見られた。

海藻の硫酸基含量は由来などによる変動が非常に大きい (Honya et al., 1999; 富士川・中島, 1975)。他の抗腫瘍活性の確認されている多糖類が免疫賦活などの間接的な作用によるものであるのと比べ、海藻由来の硫酸化多糖が間接的な作用に加え、アポトーシスなどの直接的な作用をもつのは硫酸基に由来すると考えることもできる。そこで硫酸基をより多く分子内に過剰導入した硫酸化多糖の調製を行った。これらの過剰硫酸化多糖と抽出により得られた硫酸化多糖の Meth-A 細胞の増殖に与える影響を比較した結果 (Fig. 15)、両者間に大きな違いは見られず、むしろ 72 h では硫酸基含量の多い多糖の方が弱い活性を示していた。硫酸化反応中の加水分解に伴う低分子化の可能性に加え、硫酸基の脱離等について検討していないため一概には言えないが、硫酸基による直接的な影響は考えにくいということが示唆された。よって、本硫酸化多糖の抗腫瘍活性は硫酸基による直接的な影響というよりは硫酸基によって

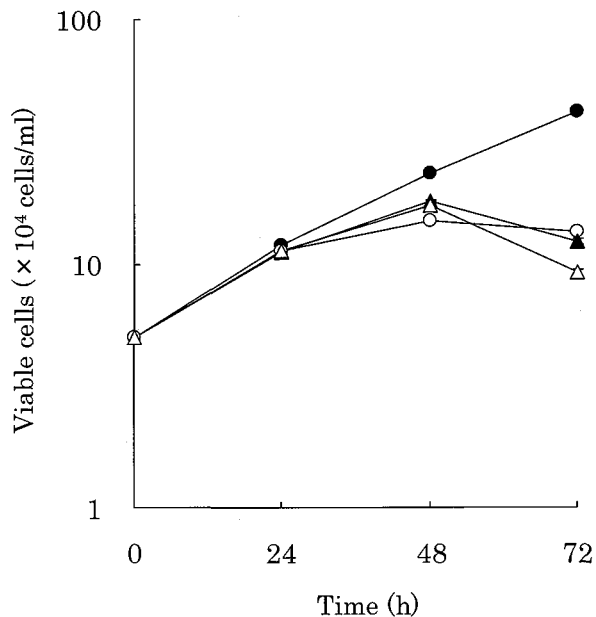


Fig. 15. Effect of SS0, SS1 and SS2 on viability of Meth-A fibrosarcoma cells.

Meth-A fibrosarcoma cells were seeded at a density of 5.0×10^4 cells/ml. Then, SS0, SS1 and SS2 were added to the culture medium and incubated for another 72 h. Viable cell number was determined by the trypan blue dye exclusion method. Data are shown as means $\pm$ S.D. ($n=3$)

—●— Control —△— SS0 —▲— SS1 —○— SS2

形作られる高次構造に依存するものであると考えるに至った。

謝 辞

本研究は「文部科学省学術フロンティア推進事業」の一部として行ったものである。記して感謝する。

種々ご教授いただいた北海道大学大学院水産科学研究院助教授安井肇博士に深謝する。また、動物実験にかかるご支援をいただいた日本化学飼料株式会社及び試料の取り扱いでご協力いただいた北海道大学大学院水産科学研究院教授佐伯宏樹博士に併せて謝意を表す。

参 考 文 献

- 浅田誠一・内出茂・小林基宏 (編) (1981) 硫酸銅中の硫酸基の定量. 図解とフローチャートによる定量分析. p. 157-160. 技報堂出版, 東京.
- Carbonnelle, D., Pondaven, P., Bosch, S., Robert, J.M. and Roussakis, C. (1999). Antitumor and antiproliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea astrearia* (Simonsen) against solid tumors: Lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M39) cell lines. *Anticancer Res.*, **19**, 621-624.
- Chen, Y.H., Tu, C.J. and Wu, H.T. (2004) Growth-inhibitory effects of the red alga *Gelidium amansii* on cultured cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(2), 180-184.
- Coombe, D.R., Parish, C.R., and Ramshaw, I.A., Snowden, J.M. (1987) Analysis of the inhibition of tumor-metastasis by sulfated polysaccharides. *Int. J. Cancer*, **39**, 82-88.
- Dische, Z. and Shetties, L.B. (1948) A specific color reaction of methylpentoses and spectrophotometric micro-method for their determination. *J. Biol. Chem.*, **175**, 595-603.
- 富士川龍郎・中島克子 (1975) ワカメ *Undaria pinnatifida* 葉状部の硫酸化多糖について. 農化誌, **49**, 455-461.
- Ishiwatari-Hayasaka, H., Kawashima, H., Osaka, T., Nagata, S. and Miyasaka, M. (1997) Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors. *Int. Immun.*, **9**(4), 627-635.
- Honya, M., Mori, H., Anzai, M. and Nisizawa, K. (1999) Monthly changes in the content of fucans, their constituents sugars and sulphate in cultured *Laminaria japonica*. *Hydrobiologia*, **398/399**, 411-416.
- Hoshino, T., Hayashi, T., Hayashi, K. and Sankawa, U. (1998) Antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**(7), 730-734.
- Itoh, H., Noda, H., Amano, H., Mizuno, T. and Ito, H. (1993) Antitumor-activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phacophycrae. *Anticancer Res.*, **13**, 2045-2052.