

マウス耳介浮腫に対する褐藻サガラメ由来の脂溶性成分による抑制効果

杉浦義正^{1†}, 臼井将勝¹, 宮田昌明¹

The suppressive effect of the lipophilic fraction of *Eisenia arborea* on ear swelling in mice

Yoshimasa Sugiura^{1†}, Masakatsu Usui¹ and Masaaki Miyata¹

Abstract: The anti-inflammatory effects of phlorotannins identified in the hydrophilic fraction of the brown alga, *Eisenia arborea*, were previously determined *in vivo* and *in vitro*. Here, we investigated the *in vivo* effect of the lipophilic fraction from this alga in mice. In ICR mice, ear swelling was induced by three sensitizers: arachidonic acid (AA), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and oxazolone (OXA). Swelling induced by AA or TPA was suppressed in a dose dependent manner after the said lipophilic fraction was applied to the mouse ears at a dose of 0.01, 0.1 and 1 mg/mouse, respectively. The suppression was similar to that by epigallocatechin gallate (EGCG), a typical natural inhibitor. On the other hand, the suppressive effect of the fraction at 1 mg/mouse on ear swelling induced by OXA was significantly lower than that of EGCG ($p < 0.01$). At a dose of 0.01 and 0.1 mg/mouse, no suppression by the fraction was observed. Therefore, lipophilic active components in the fraction may suppress immediate inflammatory reactions induced by AA or TPA, but not show suppressive effects on the delayed-type (type IV allergy) inflammatory reactions induced by OXA.

Key words: *Eisenia arborea*, anti-inflammation, allergic reactions, lipophilic fraction

緒 言

近年、アレルギー患者が増加しており、2人に1人は何らかのアレルギー症状を持つとされ、アレルギーは国民病とも呼ばれている。このように社会問題化しているアレルギーを緩和する食品およびその成分の探索が進められており、我々の研究では、褐藻サガラメ (*Eisenia arborea*) に抗アレルギー作用を見出した¹⁾。さらに、サガラメ中の抗アレルギー成分の探索を行ったところ、6種類のフロロタンニン (eckol, 6,6'-bieckol, 6,8'-bieckol, 8,8'-bieckol, phlorofucofuroeckol (PFF)-A, PFF-B) を有効成分として単離した^{2,3)}。得られたフロロタンニンの抗アレルギー作用について検討したところ、アレルギー性炎症の関連酵素であるホスホリパーゼ A₂ やリポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2、ヒアルロニダーゼの活性を抑制することが分かり^{4,5)}、マウス耳介浮腫による実験でもアレルギー性炎症の抑制が確認され

た⁶⁾。それらフロロタンニン類は、サガラメ乾燥粉末に対してメタノール/クロロホルム抽出を行い、蒸留水で溶媒分配して得られた水溶性画分に含まれており、水溶性画分 (フロロタンニン濃縮物) にも抗アレルギー作用が見出されている^{5,6)}。一方、溶媒分配すると脂溶性画分も得られるが、その脂溶性画分および含有脂溶性成分に関する抗アレルギーおよび抗炎症作用の検討は行っていない。そこで本研究では、アラキドン酸 (AA) およびホルボルエステル (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) で誘導した即時型アレルギー炎症モデルマウス⁷⁾、もしくはオキサゾロン (OXA) で誘導した遅延型 (IV型) アレルギー炎症モデルマウス⁸⁾ における耳介浮腫に対し、サガラメの脂溶性画分 (成分) が有効性を示すかどうか検証することを目的とした。

¹ 水産大学校食品科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)

[†] 別刷り請求先 (Corresponding author: ysugiura@fish-u.ac.jp)

材料と方法

試料

試料の褐藻サガラメは、三重県志摩地域の麦崎沿岸部で採取されたものを使用した。サガラメを3日間陰干した後、送風乾燥機で35℃、3日間さらに乾燥させた。その乾燥物を超遠心粉碎機 (ZM200, Retsch) で粉碎し、平均粒子径0.2 mmの乾燥微粉末を作製した。その乾燥微粉末20 gに対してメタノール80 mLで3時間抽出後、クロロホルム160 mLを添加して更に1時間、抽出を継続した。No. 2ろ紙でろ過して得られたろ液に対して蒸留水60 mLで溶媒分配し、水溶性画分と脂溶性画分に分画した。回収した脂溶性画分をロータリーエバポレーターにて濃縮・乾固したところ、固形分111.9 mgが得られた。この固形分を実験試料とし、メタノールに溶解 (100 mg/mL) して使用時まで冷凍保管 (-20℃) した。

また、陽性対照として、食品由来の抗アレルギー物質である茶カテキンの1種、エピガロカテキンガレート⁹⁾ (EGCG, Sigma-Aldrich) を用いた。

実験動物

耳介浮腫モデルとして、ICR系統のマウスを使用した。ICRマウス (雄性, 6週齢) はKBTオリエンタル社から購入し、明暗期12時間、室温23-26℃の環境下で維持飼育した。固形飼料 (MF, KBTオリエンタル) および水道水は自由摂取させた。本動物実験は、水産大学校動物実験委員会にて実施の承認を受け、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「水産大学校動物実験指針」に則って実施した (承認番号16-10, 平成28年3月24日)。

マウス耳介浮腫試験

アラキドン酸 (AA) 刺激: Youngらの方法¹⁰⁾ に準拠し、AAによる急性即時型炎症を誘導した。アセトン溶媒のAA溶液10 μL (和光純薬工業, 12.5 mg/mL, -20℃保存) とメタノール溶媒の脂溶性画分およびEGCG 5 μL (0.01, 0.1, 1 mg/5 μL) を混合し、マウス耳介に塗布した。なお、投与量0 mg/mouseの試験区には、試料溶液の代わりにメタノール5 μLのみを混合した。塗布から1時間後、マイクロメーター (547シリーズ, ミットヨ) を用いて耳介厚み (mm) を計測した。試料による耳介浮腫の抑制率 (%) は、以下の式により算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = [1 - (T - T_0) / (C - C_0)] \times 100$$

C_0 : AA刺激前の試料未投与群の耳介厚み, C : AA刺激1時間後の試料未投与群の耳介厚み, T_0 : AA刺激前の試料投与群の耳介厚み, T : AA刺激1時間後の試料投与群の耳介厚み

ホルボールエステル (TPA) 刺激: Youngらの方法¹⁰⁾ に準拠し、TPAによる慢性即時型炎症を誘導した。アセトン溶媒のTPA保存溶液 (和光純薬工業, 800 μg/mL, -20℃) を、使用直前にアセトンで希釈して80 μg/mLとした。その希釈TPA溶液10 μLとメタノール溶媒の脂溶性画分およびEGCG 5 μL (0.01, 0.1, 1 mg/5 μL) を混合し、マウス耳介に塗布した。なお、投与量0 mg/mouseの試験区には、試料溶液の代わりにメタノール5 μLのみを混合した。塗布から4時間後、マイクロメーターを用いて耳介厚み (mm) を計測した。試料による耳介浮腫の抑制率 (%) は、上記の式より同様に算出した。

オキサゾロン (OXA) 刺激: Yoshinoらの方法¹¹⁾ に準拠し、OXAによる遅延型 (IV型) アレルギー炎症を誘導した。OXA (Sigma-Aldrich) をエタノールに溶解して1%溶液を調製し、動物用シェーバー (夏目製作所) で剃毛した腹部に50 μL塗布した。5日後、アセトン溶媒の0.5% OXA溶液10 μLとメタノール溶媒の脂溶性画分およびEGCG 5 μL (0.01, 0.1, 1 mg/5 μL) を混合し、マウス耳介に塗布した。なお、投与量0 mg/mouseの試験区には、試料溶液の代わりにメタノール5 μLのみを混合した。塗布から24時間後、マイクロメーターを用いて耳介厚み (mm) を計測した。試料による耳介浮腫の抑制率 (%) は、上記の式より同様に算出した。

統計処理

抑制率 (%) および耳介肥厚値 (mm) (処置後の耳介厚みと処置前の耳介厚みの差) の平均は $n = 5$ の試験結果から算出し、平均 ± 標準偏差で表した。投与量ごとのEGCG投与群との有意差検定は、Student's t 検定 (両側) により行った。また、耳介肥厚値については、統計処理ソフト (エクセル統計2016, 社会情報サービス社) を用いたTukey-Kramer検定による多重比較検定を行った。検定の結果、 P 値が0.05未満 ($p < 0.05$) となった場合に有意差ありと判定した。

Table 1. Inhibitory effects of the administration of the lipophilic fraction and EGCG on AA-induced ear swelling in mice

Sample dose (mg/ear)	0.01	0.1	1
Lipophilic fraction	33.0 ^{N.S.} ± 5.4	40.5 ^{N.S.} ± 17.4	61.5 ^{N.S.} ± 14.3
EGCG	29.1 ± 25.3	55.3 ± 15.1	73.8 ± 26.3

Suppression effects were calculated from the results of multiple experiments (n = 5). Values are depicted as means ± standard deviations. "N. S." indicates no significant difference from EGCG. AA, arachidonic acid; EGCG, epigallocatechin gallate.

Table 2. Inhibitory effects of the administration of the lipophilic fraction and EGCG on TPA-induced ear swelling in mice

Sample dose (mg/ear)	0.01	0.1	1
Lipophilic fraction	16.9 ^{N.S.} ± 11.6	27.3* ± 15.5	66.5 ^{N.S.} ± 18.2
EGCG	35.7 ± 23.9	57.0 ± 18.2	81.3 ± 9.9

Suppression effects were calculated from the results of multiple experiments (n = 5). Values are depicted as means ± standard deviations. "*" indicates that the suppression ratio of lipophilic fraction was significantly lower than that of EGCG (p < 0.05). "N. S." indicates no significant difference from EGCG. TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; EGCG, epigallocatechin gallate.

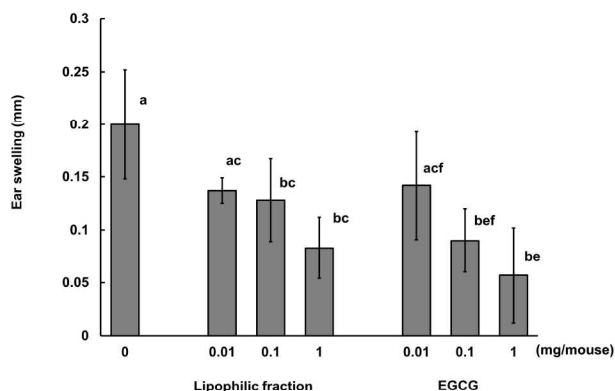


Fig. 1 Inhibitory effects of the administration of the lipophilic fraction and EGCG on AA-induced ear swelling in mice. Ear swellings were calculated from the results of multiple experiments (n=5). Values are depicted as means ± standard deviations. Differences between groups indicated by different letters are statistically significant (p<0.05). AA, arachidonic acid; EGCG, epigallocatechin gallate.

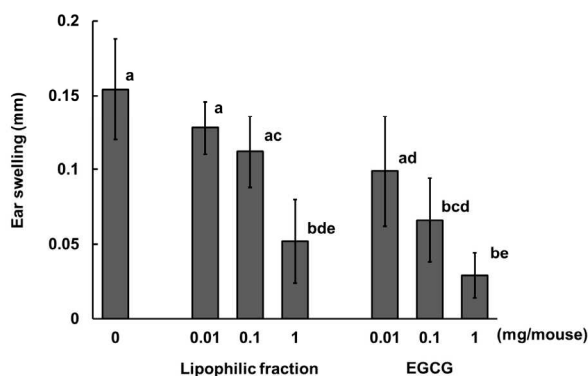


Fig. 2 Inhibitory effects of the administration of the lipophilic fraction and EGCG on TPA-induced ear swelling in mice. Ear swellings were calculated from the results of multiple experiments (n=5). Values are depicted as means ± standard deviations. Differences between groups indicated by different letters are statistically significant (p < 0.05). TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; EGCG, epigallocatechin gallate.

結 果

Table 1に示したように、AAで誘発したマウス耳介浮腫に対し、サガラメ脂溶性画分の平均抑制率は投与量が多くなるにつれて上昇した。陽性対照のEGCGと比べ、平均抑制率は投与量0.1および1 mg/mouseで若干低くなったものの有意差はなく、EGCGと同様の有効性が確認された。

またFig. 1より、用量依存性は認められなかったが、耳介肥厚値は投与量が多くなるにつれて低下した。

TPAで誘発したマウス耳介浮腫に対する抑制効果（抑制率）を、Table 2にまとめた。この結果から、脂溶性画分の平均抑制率は投与量が多くなるにつれて上昇することが分かった。陽性対照のEGCGと比較すると、投与量0.1 mg/mouseにおける平均抑制率は有意に低くなった (p < 0.05) もの、0.01および1 mg/mouseにおいてはEGCGと

Table 3. Inhibitory effects of the administration of the lipophilic fraction and EGCG on OXA-induced ear swelling in mice

Sample dose (mg/ear)	0.01	0.1	1
Lipophilic fraction	—	—	20.7** ± 16.2
EGCG	37.5 ± 9.6	77.2 ± 7.1	104.2 ± 3.0

Suppression effects were calculated from the results of multiple experiments (n = 5). Values are depicted as means ± standard deviations. "**" indicates that the suppression ratio of lipophilic fraction was significantly lower than that of EGCG ($p < 0.01$). "-" indicates that no suppression was observed. OXA, oxazolone; EGCG, epigallocatechin gallate.

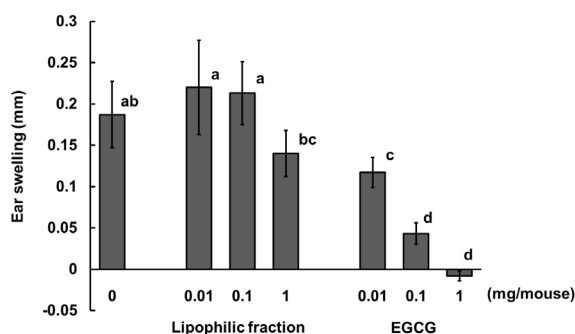


Fig. 3 Inhibitory effects of the administration of the lipophilic fraction and EGCG on OXA-induced ear swelling in mice. Ear swellings were calculated from the results of multiple experiments (n=5). Values are depicted as means ± standard deviations. Differences between groups indicated by different letters are statistically significant ($p < 0.05$). OXA, oxazolone; EGCG, epigallocatechin gallate.

有意差はなく、同様の有効性が確認された。またFig. 2より、用量依存的に耳介肥厚値は低下した。

Table 3に、OXAで誘発したマウス耳介浮腫に対する脂溶性画分の抑制効果（抑制率）を示した。AAおよびTPA誘発のマウス耳介浮腫に対する抑制効果（Table 1 and 2; Fig. 1 and 2）とは異なり、投与量0.01および0.1 mg/mouseでは有効性が認められず、1 mg/mouseで20%程度の抑制であった。投与量1 mg/mouseにおける抑制率は、陽性対照のEGCGと比較しても有意に低く（ $p < 0.01$ ）なっていた。またFig. 3より、投与量1 mg/mouseの耳介肥厚値は投与量0 mg/mouse試験区に対して有意に低下していたが、EGCG 0.01 mg/mouse投与群と同程度の効果にとどまっていた。このように、EGCGとは異なり、OXAにより誘導される遅延型（IV型）アレルギー炎症に対しては有効性が低いことが示唆された。

考 察

本研究では、褐藻サガラメのメタノール/クロロホルム混合液による抽出で得られた脂溶性画分について、アレルギー性炎症に対する有効性を動物実験により検討した。その結果、AAおよびTPA誘発の耳介浮腫に対し、投与量が多くなるにつれて抑制効果が強くなる傾向が確認された。有効成分としてはまずフロロタンニンが考えられるため、脂溶性画分に含まれるフロロタンニン含量をフォーリン・デニス法¹²⁾によりフェノール性化合物として計測した。その結果、脂溶性画分111.9 mg中34.4 mgがフェノール性化合物（フロロタンニン）であることが分かった。したがって、脂溶性画分中の有効成分はフロロタンニンの可能性が考えられたが、本研究ではAA刺激による耳介浮腫に対してはEGCGと同等の有効性を示したものの、EGCGと比較してTPA刺激に対しては低い傾向、OXA刺激に対しては有効性が認められない（0.01 or 0.1 mg/mouse）か有意に低い効果（1 mg/mouse）であった。Sugiuraらの報告⁶⁾によると、サガラメ水溶性画分（フロロタンニン濃縮物）はTPA刺激に対して、投与量0.01および0.1 mg/mouseにおいて抑制率はそれぞれ26.6および38.7%であった。OXA刺激に対しては、投与量0.01および0.1 mg/mouseにおいて抑制率はそれぞれ32.5および62.5%であったという。以上より、TPA刺激およびOXA刺激に対する有効性は、本研究結果とSugiuraらの報告⁶⁾で違いがみられるので、脂溶性画分中のフロロタンニンと水溶性画分中のそれとは抑制機序が異なっているかもしれない。もしくは、フロロタンニン以外の有効成分の関与も考えられる。

フロロタンニン以外では、褐藻由来の抗炎症・抗アレルギー性の脂溶性成分として、フコキサンチンやフコステロールが報告されている^{13, 14)}。フコキサンチンは褐藻類の中でもコンブやワカメ、アカモクに多く含まれていることが知られており、サガラメの近縁種であるアラメ（*Eisenia*

bicyclis)にも含まれている(7.5 mg/100 g湿重量)¹⁵⁾。また、フコステロールもアラメから単離されており、マウス由来マクロファージ株化細胞(RAW 264.7)におけるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2の発現を抑制することで抗炎症性を示すとされている¹⁶⁾。本研究で用いた起炎剤TPAはCOX-2発現を介して慢性の即時型炎症を誘導することが知られており¹⁷⁾、かつ、Table 2のように脂溶性画分はTPA誘発のマウス耳介浮腫を抑制したことから、脂溶性画分中の有効成分としてフコステロールも候補としてあげられる。

最近、アカモクから単離された脂溶性成分の葉緑素(クロロフィル^{c2})がラット由来好塩基球白血球細胞(RBL-2H3)による脱顆粒を抑制したことから、クロロフィル^{c2}の抗アレルギー作用が見出された^{18, 19)}。葉緑素は光合成を行うために植物が普遍的に含有している成分であり、脂溶性画分中の有効成分として可能性が高いと考えている。

本研究結果では、サガラメ脂溶性画分はAAおよびTPA刺激によるマウス耳介浮腫に対して用量依存的な抑制傾向を示し、OXA刺激に対しては弱い抑制であったので、脂溶性画分中の抗炎症(抗アレルギー)性成分は、AAおよびTPA刺激で誘導されるような即時型炎症には有効性を示し、OXA刺激で誘導されるような遅延型炎症にはあまり有効性を示さない可能性が考えられた。また、報告例と照らし合わせながらサガラメ脂溶性画分中の有効成分について考察したが、本研究で有効性を示した成分について詳細な分析を行い、サガラメ脂溶性画分の有用性を実証する必要がある。

謝 辞

本研究にご協力いただいた水産大学校食品科学科食品機能学講座の三谷結香氏、荻原祥吾氏、田中真邦氏、田中利枝氏および橋口由依氏に感謝申し上げます。また、本研究は平成28年度「学内競争的資金」の助成によるものである。

文 献

- 1) Sugiura Y., Takeuchi Y., Kakinuma M., Amano H.: Inhibitory effects of seaweeds on histamine release from rat basophile leukemia cells (RBL-2H3). *Fish Sci*, **72**, 1286-1291 (2006)
- 2) Sugiura Y., Matsuda K., Yamada Y., Nishikawa M., Shioya K., Katsuzaki H., Imai K., Amano H.: Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2807-2811 (2006)
- 3) Sugiura Y., Matsuda K., Yamada Y., Nishikawa M., Shioya K., Katsuzaki H., Imai K., Amano H.: Anti-allergic phlorotannins from the edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Food Sci Technol Res*, **13**, 54-60 (2007)
- 4) Sugiura Y., Matsuda K., Yamada Y., Imai K., Kakinuma M., Amano H.: Radical scavenging and hyaluronidase inhibitory activities of phlorotannins from the edible brown alga *Eisenia arborea*. *Food Sci Technol Res*, **14**, 595-598 (2008)
- 5) Sugiura Y., Matsuda K., Okamoto T., Yamada Y., Imai K., Ito T., Kakinuma M., Amano H.: The inhibitory effects of components from a brown alga, *Eisenia arborea*, on degranulation of mast cells and eicosanoid synthesis. *J Funct Foods*, **1**, 387-393 (2009)
- 6) Sugiura Y., Tanaka R., Katsuzaki H., Imai K., Matsushita, T.: The anti-inflammatory effects of phlorotannins from *Eisenia arborea* on mouse ear edema by inflammatory inducers. *J Funct Foods*, **5**, 2019-2023 (2013)
- 7) Rao T.S., Currie J.L., Shaffer A.F., Isakson P.C.: Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, **17**, 723-741 (1993)
- 8) Meurer R., Opas E.E., Humes J.L.: Effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on inflammation associated with oxazolone-induced delayed hypersensitivity. *Biochem Pharmacol*, **37**, 3511-3514 (1988)
- 9) Tachibana, H.: Green tea polyphenol sensing. *P Jpn Acad B-Phys*, **87**, 66-80 (2011).
- 10) Young J.M., Spires D.A., Bedord C.J., Wagner B., Ballaron S.J., De Young, L.M.: The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J Invest Dermatol*, **82**, 367-371 (1984)
- 11) Yoshino K., Kawaguchi T., Yamazaki K., Sano, M.: Preventive effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy induced by oxazolone and

- its antiinflammatory activities. *J Technology and Education*, **17**, 57-65 (2010)
- 12) Folin O. and Denis W.: A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem*, **22**, 305-308 (1915)
- 13) Sugiura Y., Kinoshita Y., Usui M., Tanaka R., Matsushita T., Miyata M.: The suppressive effect of a marine carotenoid, fucoxanthin, on mouse ear swelling through regulation of activities and mRNA expression of inflammation-associated enzymes. *Food Sci Technol Res*, **22**, 227-234 (2016)
- 14) Sun Z., Mohamed M.A.A., Park S.-Y., Yi T.-H.: Fucosterol protects cobalt chloride induced inflammation by the inhibition of hypoxia-inducible factor through PI3K/Akt pathway. *Int Immunopharmacol*, **29**, 642-647 (2015)
- 15) 金沢和樹：生体内で有効な機能を発揮する褐藻カロテノイドのフコキサンチン. *日食科工誌*, **59**, 49-55 (2012)
- 16) Jung H.-A., Jin S.-E., Ahn B.-R., Lee C.-M., Choi J.-S.: Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*, **59**, 199-206 (2013)
- 17) Kujubu D.A., Fletcher B.S., Varnum B.C., Lim R.W., Herschman, H.R.: TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible RNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, **266**, 12866-12872 (1991)
- 18) Yoshioka H., Kamata A., Konishi T., Takahashi J., Oda H., Tamai T., Toyohara H., Sugahara T.: Inhibitory effect of chlorophyll c2 from brown algae, *Sargassum horneri*, on degranulation of RBL-2H3 cells. *J Funct Foods*, **5**, 204-210 (2013)
- 19) Yoshioka H., Ishida M., Nishi K., Oda H., Toyohara H., Sugahara T.: Studies on anti-allergic activity of *Sargassum horneri* extract. *J Funct Foods*, **10**, 154-160 (2014)