

海洋深層水由来珪藻抽出物のHyaluronidase阻害活性

Hyaluronidase Inhibitory Effect in Diatom Extracts isolated from Deep Sea Water

久保 義博¹・小善 圭一²・瀬戸 陽一³

Yoshihiro KUBO, Keiichi SHOZEN and Youichi SETO

Abstract

Hyaluronidase inhibitory effect was found in the water extract of a diatom species, *Navicula directa* (W. Smith) Ralfs (*N. directa*) isolated from deep sea water (DSW) of Toyama Bay. Hyaluronidase inhibitory effect (IC_{50} : 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of ethanol insoluble fraction from the water extract was 4 times stronger than that (IC_{50} : 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of a current anti-allergic agent, disodium cromoglycate (DSCG). Ethanol insoluble fraction was very thermostable and showed a wide range of pH stability. On the basis of these data, ethanol insoluble fraction seemed to be useful for the treatment of allergic diseases, such as atopic dermatitis and pollinosis.

Key Words: *Navicula directa* (W. Smith) Ralfs, deep sea water, hyaluronidase inhibitory effect, atopic dermatitis, pollinosis

要 旨

富山湾の深層水から単離した珪藻 *Navicula directa* (W. Smith) Ralfs (以下 *N. directa* と略す) の水抽出液に hyaluronidase 阻害活性が認められることを明らかにした。水抽出液のエタノール不溶性画分における hyaluronidase の 50 % 阻害濃度 (以下 IC_{50} と略す) は 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示し、市販の抗アレルギー剤として有効性が注目されているクロモグリク酸ナトリウム (以下 DSCG と略す, IC_{50} : 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$) より 4 倍も高いことが明らかになった。また、エタノール不溶性画分に含まれる hyaluronidase 阻害成分は熱や広い範囲の pH に対して安定であった。このようなことから、*N. directa* のエタノール不溶性画分はアトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患の新しい治療薬の可能性を示唆しているように思われる。

キーワード: 深層水, *Navicula directa* (W. Smith) Ralfs, hyaluronidase 阻害活性, アトピー性皮膚炎, 花粉症

1. はじめに

富山県では平成 7 年 (1995 年) 日本で 2 番目の深層水利用研究施設が完成し、本格的な研究がスタートした。富山湾の深層水は「日本海固有水」と呼ばれ、太平洋側の深層水とは全く異なる特性を有する

海洋生物や生理活性物質が存在する可能性がある。

著者は既に海洋深層水中の種々の微量成分がプロテアーゼの温度安定性試験において、明らかに保護効果を示すこと (久保, 1997) や、抗菌活性試験において抗菌作用を増強することを確認し (久保, 1998), 海洋深層水自身が未利用資源の開発研究に

¹富山県薬事研究所 (〒939-0363 富山県射水郡小杉町中太閤山 17-1)

²富山県水産試験場 (〒936-8536 富山県滑川市高塚 364)

³(財)環日本海環境協力センター (〒930-0856 富山県富山市牛島新町 5-5)

において興味深い研究対象であることを報告した（久保, 1997, 1998）。

近年、アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患が急増し、深刻な社会問題にもなっていることから、天然物からの抗アレルギー性物質の検索が活発に行われている（前田ら, 1987；沢辺ら, 1990；前田ら, 1990；Maeda *et al*, 1991；前田ら, 1991；中込ら, 1999）。

今回、微細藻類などの培養による有用物質（医薬、農薬、食品など）の抽出・生産に関する研究の一環として、富山湾の深層水から単離し、富山湾の深層水のみを栄養源として純粋培養することに成功した *N. directa* について抗アレルギー活性の指標とされている hyaluronidase 阻害活性を測定したところ、興味ある知見を得たので報告する。

2. 実験方法

(1) 珪藻株の単離培養

珪藻株は富山県試験場内で汲み上げた深層水から単離し、顕微鏡下において *N. directa* であると同定された。この珪藻株を 2 ℓ の三角フラスコ内で 1.8 ℓ の海洋深層水のみを栄養源として静置下で 20 °C, 12 時間照明（200～800 ルックス）及び 12 時間暗黒の条件で純粋培養した。

なお、海洋深層水は表層海水に比べ、窒素やリンなどの栄養塩が豊富に含まれている上に、清浄性が高く、雑多な微細藻類が繁殖しないという利点があるので、培養は海洋深層水のみで行い、表層海水を用いた培養試験は行わなかった。

(2) 試料の調製

三角フラスコの底面に付着して増殖した培養 30 日目の *N. directa* をピペティングにより剥離させた後、遠心分離により集めて凍結乾燥した。凍結乾燥した珪藻試料の調製については Fig. 1 に示した。すなわち、凍結乾燥物は精製水に懸濁し、超音波処理による細胞破碎後、90 °C で 30 分間抽出を行い、更に遠心分離により得た上清を凍結乾燥して水抽出液とした。この水抽出液に 80 % エタノールを加え、溶解した部分をエタノール可溶性画分、生じた沈澱をエタノール不溶性画分とし、それぞれ凍結乾燥したものを試料とした。

(3) 試 薬

1) Hyaluronidase 阻害活性測定用の試薬：

1.1) 酵素：hyaluronidase (from bovine testis); Sigma 社製, Type IV-S

1.2) 基質：hyaluronic acid potassium salt (from rooster comb, 以下 HA と略す); 和光純薬工業（株）製, 生化学用

1.3) Buffer: 0.1 M 酢酸 buffer (pH 4.0 に調整)

1.4) Compound 48/80: Sigma 社製

1.5) *p*-Dimethylaminobenzaldehyde (以下 *p*-DAB と略す): 和光純薬工業（株）製, 生化学用

1.6) *p*-DAB 試薬: *p*-DAB 10 g, 10N 塩酸溶液 12.5 ml, 酢酸 87.5 ml を混合し, 使用直前に酢酸で 10 倍に希釈した。

1.7) ホウ酸溶液: ホウ酸 4.95 g に水 50 ml を加え, 1N 水酸化ナトリウム溶液で pH

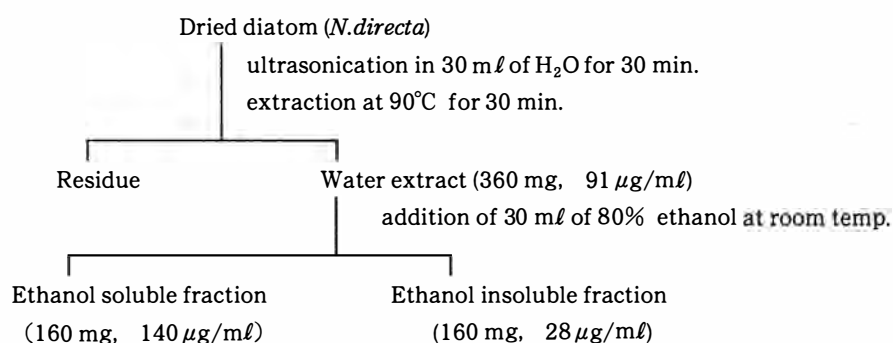


Fig. 1 Isolation procedure of hyaluronidase inhibitors from *N. directa*. Yield (mg) and 50 % inhibitory concentration (IC_{50} : $\mu g/ml$) of each fraction from 1.1 g of dried *N. directa* are indicated in parentheses.

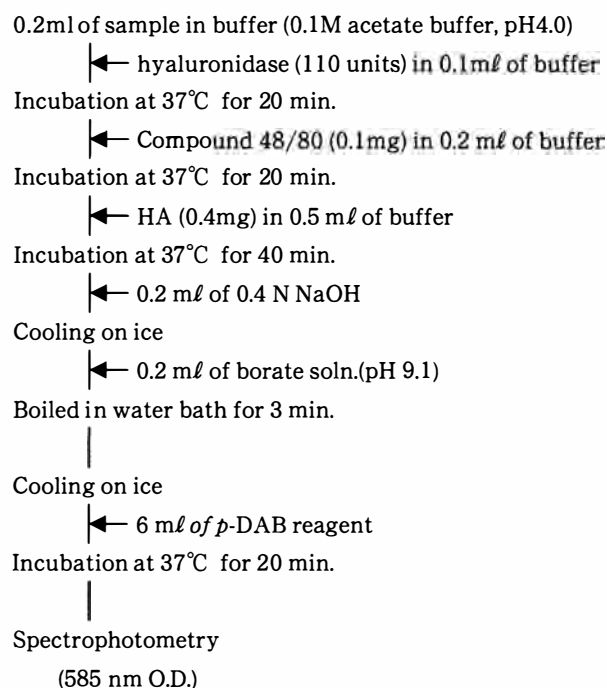


Fig. 2 Assay of hyaluronidase activity

9.1 に調整した後、水を加えて 100 ml とした。

2) 抗炎症剤および抗アレルギー剤：

2.1) aspirin：和光純薬工業（株）製，試薬特級

2.2) glycyrrhizin：和光純薬工業（株）製，生化学用

2.3) sodium cromoglicate（以下 DSCG と略す）：藤沢薬品工業（株）

なお，DSCG は温度および pH の安定性試験において比較対照の陽性コントロールとしても用いた。

3) 抗ヒスタミン剤：

3.1) chlorpheniramine maleate：和光純薬工業（株）製，生化学用

4) その他の試薬：試薬特級品を用いた。

(4) Hyaluronidase 活性の測定

牛睾丸由来の hyaluronidase (Sigma, Type IV-S) を用いて，compound 48/80 による不活性型 hyaluronidase の活性化段階の阻害活性を前田らの方法（前田ら，1987）に準じて Fig. 2 に示す手順により測定した。すなわち，適量の被験試料を 0.1M 酢酸 buffer (pH 4.0) 0.2 ml に溶かして試験

管にとり，同 buffer 0.1 ml に溶かした hyaluronidase (110 units) を加え，37 °C で 20 分間インキュベートした後，同 buffer 0.2 ml に溶かした compound 48/80 (0.1 mg) を加え，更に 37 °C で 20 分間インキュベートする。最後に，同 buffer 0.5 ml に溶かした HA (0.4 mg) を加えて 37 °C で 40 分間インキュベートした後，0.4N NaOH 0.2 ml を加えて氷冷し，ホウ酸溶液 (pH 9.1) 0.2 ml を加えて 3 分間煮沸する。氷冷後，p-DAB 試薬 6 ml を加えて，37 °C で 20 分間インキュベートした後，585 nm における吸光度 (O.D. 585) を測定した。

(5) 抗炎症剤及び抗アレルギー剤などによる hyaluronidase 阻害作用

試料は上記 0.1 M 酢酸 buffer に溶解して試料溶液とし，対照には試料溶液の代わりに同 buffer を用いた。また，それぞれのブランクとして，酵素溶液の代わりに同 buffer を用いた。

阻害活性は次の式で求められる阻害率で表した。

$$\text{阻害率}(\%) = \left[\frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} \right] \times 100$$

A：対照溶液の 585 nm における吸光度 (O.D. 585)

B：対照溶液のブランクの O.D. 585

C：試料溶液の O.D. 585

D：試料溶液のブランクの O.D. 585

(6) 温度安定性

N. directa のエタノール不溶性画分及び DSCG を酢酸 buffer を用いてそれぞれ 0.1 mg/ml の濃度に調製した。その試料薬を 30, 50, 70, 90 および 100 °C の各温度に 10 分間保持した後に急冷し、前述の方法で各温度における残存活性を測定した。

(7) pH 安定性

buffer として、KCl-HCl buffer (pH 2.0), KH₂PO₄-NaOH buffer (pH 4.0), KH₂PO₄-NaOH buffer (pH 6.0), H₃BO₃-KCl-NaOH buffer (pH 8.0), NaHCO₃-NaOH buffer (pH 10.0) 及び Na₂HPO₄-NaOH buffer (pH 12.0) を用い、それぞれ 0.1 mg/ml の濃度に調製した *N. directa* のエタノール不溶性画分および DSCG を 37 °C, 10 分間保持した後に急冷し、前述の方法で各 pH における残存活性を測定した。

3. 結 果

(1) *N. directa* からの hyaluronidase 阻害物質の分離

Fig. 1 に示す手順に従って、凍結乾燥した 1.1 g の *N. directa* を精製水に懸濁し、超音波ホモジナイザー（日本精機製作所製 US-300T）を用いて顕微鏡下で 90 % 以上の細胞が破壊されるまで処理した。水抽出液の hyaluronidase の IC₅₀ が 91 µg/ml と強い阻害作用を示したので、80 % エタノールを加えることによって、さらに分画したところ、エタノール可溶性画分の hyaluronidase の IC₅₀ は 140 µg/ml であった。一方、エタノール不溶性画分の hyaluronidase の IC₅₀ は 28 µg/ml という非常に強い阻害作用を示した。

(2) 抗炎症剤及び抗アレルギー剤などによる hyaluronidase 阻害作用

検討した種々の薬剤および *N. directa* のエタノール

Table 1. Inhibition of hyaluronidase by various agents and ethanol insoluble fraction from *N. directa*

Drug	IC ₅₀ *(µg/ml)
aspirin	1,260
glycyrrhizin	140
sodium cromoglicate (DSCG)	110
chlorpheniramine maleate	4,010
ethanol insoluble fraction from <i>N. directa</i>	28

* 50% inhibitory concentration

ル不溶性画分はすべて hyaluronidase 阻害作用を有していた。結果は Table 1 に hyaluronidase の 50 % 阻害濃度 (IC₅₀) で示した。

非ステロイド性の酸性抗炎症剤である aspirin やアレルギー性鼻炎などに適用される抗ヒスタミン剤の chlorpheniramine maleate の hyaluronidase 阻害作用と比較して、抗炎症作用のほかに抗アレルギー作用も有する glycyrrhizin や抗アレルギー剤の DSCG および *N. directa* のエタノール不溶性画分の hyaluronidase 阻害作用は著しく強く特異的であった。

また、これらのうち *N. directa* のエタノール不溶性画分の hyaluronidase 阻害作用は市販され有効性が注目されている DSCG の hyaluronidase 阻害作用よりも 4 倍も強いことが認められた。

(3) 温度安定性

Fig. 3 に示すように *N. directa* のエタノール不溶性画分の hyaluronidase 阻害作用は 90 °C までは全く安定で、100 % の活性を保ち、100 °C でも 95 % の活性を維持したことから、熱に対して非常に安定であることが認められた。

一方、DSCG の hyaluronidase 阻害作用は 50 °C 以上では 90 % に低下したが、熱に対しては比較的安定であると考えられる。

(4) pH 安定性

Fig. 4 に示すように *N. directa* のエタノール不溶性画分は pH 8 や 10 で 95 %, pH 12 でも 80 % の hyaluronidase 阻害作用を示したことから、広い範囲の pH に対して安定であることが認められた。

一方、DSCG の hyaluronidase 阻害作用は pH 6

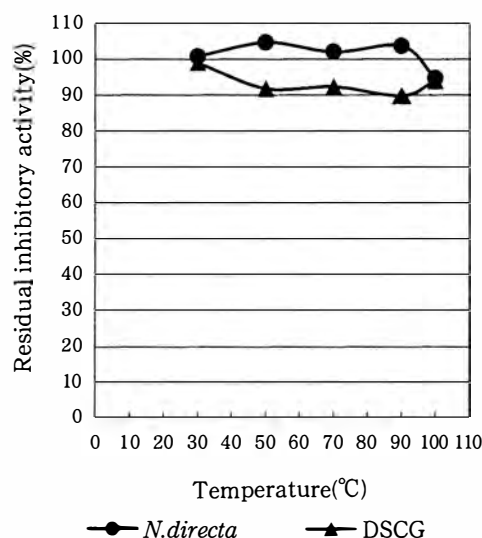


Fig. 3 Thermostability of ethanol insoluble fraction from *N. directa* and DSCG

で急激に失活し、8 以上では 20 %に低下した。このことから DSCG の hyaluronidase 阻害作用は pH に対する感受性が高いことが示唆された。

4. 考 察

N. directa からの hyaluronidase 阻害物質の分離において、生薬の一般的な抽出方法である熱水抽出を行い、続いて 80 %エタノールを加えることによって水抽出液中の阻害成分は主としてエタノール不溶性画分中に効率的に回収された。

抗炎症剤および抗アレルギー剤には hyaluronidase 阻害作用をもつものが知られている。Glycyrrhizin は抗炎症作用のほかに抗アレルギー作用も有する。また、DSCG は抗アレルギー剤であり、抗原抗体反応に伴って起こる肥満細胞からのヒスタミンなど化学伝達物質の遊離を抑制する作用機序が知られている（日本医薬情報センター、1998）、Glycyrrhizin 及び DSCG に特異的に強い hyaluronidase 阻害作用が認められたことは、hyaluronidase と炎症及びアレルギー反応との関連性を示唆しており、今後の研究課題として興味ある知見である。

N. directa からのエタノール不溶性画分の hyaluronidase 阻害作用は、市販され有効性が注目されている DSCG より 4 倍も強いことは注目に値する。

さらに、熱に対する高い安定性や、広い範囲の

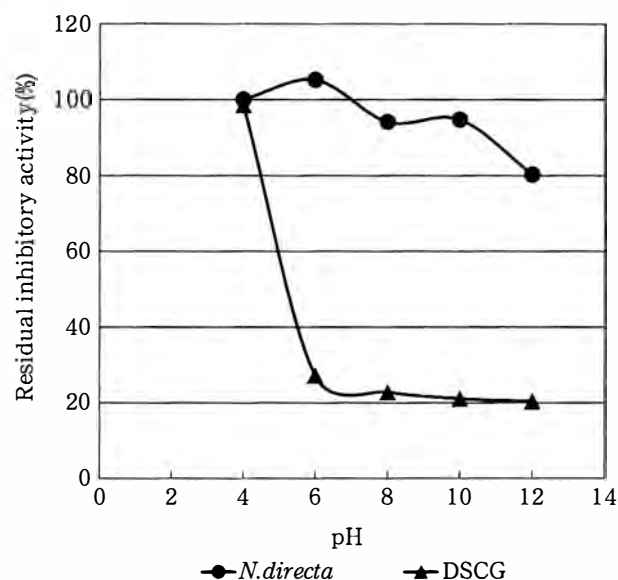


Fig. 4 pH stability of ethanol insoluble fraction from *N. directa* and DSCG

pH に対する安定性も認められたことから、*N. directa* からのエタノール不溶性画分はアトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患の新しい治療薬に応用できる可能性がある。

なお、hyaluronidase 阻害物質については、現在までのところを多糖類と思われるが、今後、この阻害物質の同定と生理活性の評価について検討を行う予定である。

また、最近では転移性の癌細胞で hyaluronidase が特異的に発現していることや複雑な血管新生の過程に hyaluronidase が深く関与している可能性が報告されている（戸井田ら、1999）ことから、*N. directa* のエタノール不溶性画分を含めたこの酵素の特異的阻害剤が抗癌剤や抗血管新生剤のような医薬品としての利用も期待できる。

謝 辞

本研究にあたり、有益なご助言をいただきました富山県薬事研究所長 鈴木 英世博士ならびに同研究所職員諸氏に感謝いたします。なお、本研究は「富山県が優先的に取り組むべき非水産分野における深層水利用事業」の一環として行ったものです。ここに謝意を表します。

文 献

- 久保義博 (1997): 海洋微生物を起源とするプロテアーゼの特性 (第2報). 富山県薬事研究所年報, **24**, 25-28.
- 久保義博 (1998): 抗菌作用におよぼす海洋深層水の影響. 富山県薬事研究所年報, **25**, 80-82.
- 前田有美恵・山本政利・増井俊夫・中込和哉 (1987): 抗炎症剤, 抗アレルギー剤および漢方エキス製剤の *hyaluronidase* 阻害作用. 静岡県衛生環境センター報告, **30**, 41-45.
- 前田有美恵・山本政利・増井俊夫・杉山 清・横田正実・中込和哉・田中秀興・高橋宇正・小林利彰・小林栄人 (1990): 茶抽出液の *Hyaluronidase* 阻害活性. 食品衛生学雑誌, **31**, 233-237.
- 前田有美恵・山本政利・増井俊夫 (1991): ヒアルロニダーゼ阻害活性を指標とした柑橘類の抗アレルギー作用. 静岡県衛生環境センター報告, **34**, 19-23.
- Maeda, Y., M. Yamamoto, T. Masui, K. Sugiyama, M. Yokota, N. Okada, K. Sugiyama, H. Katayama and

K. Nakagomi (1991): Hyaluronidase Inhibitor in the Fruit of *Citrus reticulata* BLANCO. *Eisei Kagaku*, **37**, 205-210.

中込和哉・高木しのぶ・畑田清隆・岡 修一 (1999): 海藻抽出物のマスト細胞脱顆粒抑制活性. 花粉症研究会会報, **10**, 8-15.

日本医薬情報センター編 (1998): 医療薬日本医薬品集, p. 544-547, 薬業時報社, 東京.

沢辺善之・岩上正蔵・前田有美恵・中込和哉・鈴木澄子・中澤 裕之 (1990): ギムネマ・シルベスタ (*Gymnema sylvestre* R. Br) のヒアルニダーゼ阻害作用成分に関する研究. 衛生化学, **36**, 314-319.

戸井田敏彦・荻田義明・チャイデッドガムジョンアモンラット・豊田英尚・今成登志男 (1999): 尿中ヒアルロニダーゼの分析. 第13回 生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集, p. 121-122.

(2002. 3. 20 受付, 2002. 8. 1 受理)