

アメフラシ抽出物の抗アレルギー活性の評価

原田靖子・菅原達也・酒井祥太・西村優輝・蒲原 聡・服部克也・平田 孝

Evaluation of anti-allergic activity of sea hare *Aplysia kurodai* extractHARADA Yasuko^{*1}, SUGAWARA Tatsuya^{*2}, SAKAI Shota^{*2}, NISHIMUYA Yuki^{*2},
KAMOHARA Satoru^{*1}, HATTORI Katsuya^{*1}, and HIRATA Takashi^{*2}キーワード: アメフラシ, 抗アレルギー, RBL-2H3, β -ヘキソサミニダーゼ

アメフラシ *Aplysia kurodai* やアマクサアメフラシ *A. juliana* は愛知県沿岸域に普遍的に見られる軟体動物であり、特に春季には産卵のため干潟岩礁域に蟠集するが、食用価値はほとんどなく漁獲利用はなされていない。これらアメフラシは岩礁域に植生しているワカメやアオサ類を始め、1998年頃まで伊勢湾湾口域などに藻場を形成していたサガラメも摂食する。特に柔らかい葉体を好んで摂食するため、消失したサガラメ藻場再生のため移植したサガラメ幼体が選択的に摂食され、藻場再生の障害となっている（蒲原ら、未発表）。移植したサガラメ種苗の保護、さらには藻場の再生のためにはアメフラシの摂食を防御することが求められる。アイゴなど魚類の摂食に対しては防御網で隔離することが有効とされているが、アメフラシは体の柔軟性が高く、網目や底部と網裾の隙間から内部に容易に侵入してくるため隔離防御は困難と考えられている。こうしたことから、サガラメ藻場を再生しようとする海域のアメフラシ個体密度を調節してサガラメに対するアメフラシの摂食圧を下げるのが求められている。個体密度の調整には漁獲行為が有効であるため、アメフラシを漁獲対象とするために、食用ではなく生理活性物質の活用を考えた。アメフラシ属からは、抗菌・抗腫瘍活性を示すタンパク質として Aplysianin,¹⁾ Dolabellin,²⁾ Cyplasin,³⁾ Aplyronine A,⁴⁾ 及び APIT⁵⁾ などが見つかっているが、近年問題となっているスギ花粉症やシックハウス症候群などのアレルギー疾患に対する効果については明らかとなっていない。そこで本研究では、アメフラシ抽出物の抗アレルギー活性についてラット培養細胞を用いて評価したので報告する。

材料及び方法

(1) サンプルング及び抽出物の調製

アメフラシ及びアメフラシ卵は、2006年5～6月の干潮時に愛知県知多郡南知多町豊浜地先にて採集した。数個体のアメフラシをミキサーにて破碎した後、液体窒素を加えながら摩砕した。常温の蒸留水（以下冷水）、100%エタノール、及び100%ヘキサン各100 mLに摩砕したアメフラシを100 gずつ浸漬し、24時間後にろ過して残渣を除いたものを各抽出物とした。アメフラシ卵についても同様に抽出物を得た。また、数十個体のアメフラシに物理的的刺激を与えて紫汁を放出させ、50 mL程度採取した。

冷水抽出物及び紫汁各30 mLはポアサイズ0.8 μ mのフィルターにてろ過した後、15 mLを透析用セルロースチューブ（三光純薬株式会社、透過分子量14000）で一晩透析した。これら冷水抽出物及び紫汁は凍結乾燥した後、100 mg/mLとなるようPBSに溶解した。なお、透析した紫汁については溶液の粘度が高く扱い難かったため、10 mg/mLとした。

各エタノール抽出物及び各ヘキサン抽出物はロータリーエバポレーターにて乾燥した後、100 mg/mLとなるようジメチルスルホキシドに溶解した。

(2) 細胞毒性の評価

各抽出物の細胞毒性の影響を排除するため、細胞生存率の濃度依存性をWST-1法⁶⁾により調べた。実験にはラット好塩基球白血病細胞株（RBL-2H3細胞）を用い、細胞の培養は10%ウシ胎児血清（FCS）、100 U/mLペニシリン、及び100 μ g/mLストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地（SIGMA社、以下培養液）を用いてCO₂インキュベータ（37°C、5%CO₂）内で行った。96穴マ

^{*1} 愛知県水産試験場漁業生産研究所（Marine Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Toyohama, Minamichita, Aichi 470-3412, Japan）

^{*2} 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻（Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan）

マイクロプレートに 1×10^5 cells/mL に調整した RBL - 2H3 細胞懸濁液を $100 \mu\text{L}$ ずつ播種した後, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の各抽出物を含む培養液を添加した。なお, 透析した紫汁については 0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した。24 時間培養後, WST-1 試薬を $10 \mu\text{L}$ ずつ加えて 2 時間静置し, マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定して細胞毒性を評価した。有意水準については, ANOVA 解析後, Dunnett 法を用いて検定した。

(3) 抗アレルギー活性の評価

抗アレルギー活性の評価は, 脱顆粒の際にヒスタミン等と同時に放出される β -ヘキソサミニダーゼを指標として行った。96 穴マイクロプレートに 1.5×10^5 cells/mL に調整した RBL - 2H3 細胞懸濁液を $100 \mu\text{L}$ ずつ播種した後, ラット抗 DNP-IgE 抗体 (SIGMA 社, 終濃度 0.45 $\mu\text{g/mL}$) を含む培養液にて 24 時間感作した後, 無血清培地で 1 回洗浄し, 各抽出物を含む培養液 $100 \mu\text{L}$ を添加した。各抽出物は, WST-1 法で細胞毒性を示さなかった範囲内の最高濃度で添加した。2 時間インキュベートした後, $20 \mu\text{L}$ の抗原 (DNP-BSA, Invitrogen, 社 終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$) を加えて 20 分間脱顆粒刺激を行った。なお, 抗原のみを添加した細胞をポジティブコントロールとした。 β -ヘキソサミニダーゼ放出量を測定するため, 10 分間氷冷して反応を停止させ, 氷上で上清 $50 \mu\text{L}$ を別の 96 穴マイクロプレートに移し, 0.1M クエン酸バッファに溶解した p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (SIGMA 社) を $50 \mu\text{L}$ 加えた。37°C で 1 時間インキュベートした後, $100 \mu\text{L}$ の 0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH10.0) で反応を停止し, マイクロプレートリーダーにて 405 nm の吸光度を測定した。また, 細胞内残存量を測定するため, 無血清培地で洗浄後, 0.1% Triton X-100 溶液で 1 時間インキュベートして細胞を溶解し, 上記と同様の手順で吸光度を測定した。 β -ヘキソサミニダーゼ遊離率は以下の式にて求めた。

β -ヘキソサミニダーゼ遊離率 (%)

$$= \text{放出量} / (\text{放出量} + \text{細胞内残存量}) \times 100$$

また, 冷水抽出物についてはカルシウムイオノフォア (A23187) で脱顆粒を誘発した場合も同様に検討した。96 穴マイクロプレートに 1.5×10^5 cells/mL に調整した RBL - 2H3 細胞懸濁液を $100 \mu\text{L}$ ずつ播種した後, 各抽出物を含む培養液 $100 \mu\text{L}$ にて 2 時間培養した後, $20 \mu\text{L}$ の A23187 (1 μM) を加えて 20 分間インキュベートし脱顆粒刺激を行った。 β -ヘキソサミニダーゼ量の測定は上記と同様に行った。有意水準については, ANOVA 解析後, Dunnett 法を用いて検定した。

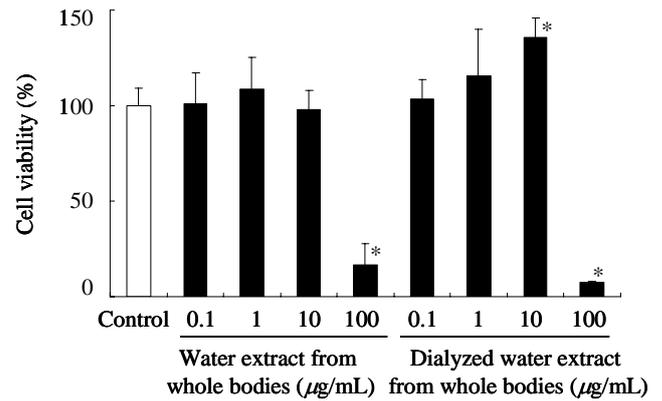


Fig. 1 Effects of water extracts from whole bodies of *A. kurodai* on the viability of RBL-2H3 cells. Number of viable cells were estimated by WST-1 assay and expressed as a percentage of the control. Control experiment was carried out without the extracts. Values are given as means \pm SD, n=4. *, Significantly different from the control (Dunnett's test after one-way ANOVA, $P < 0.05$).

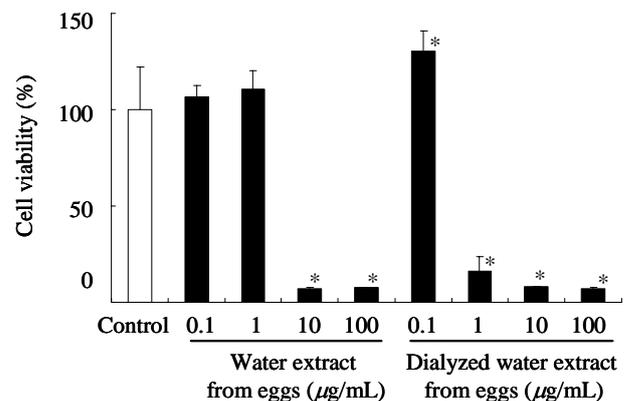


Fig. 2 Effects of water extracts from eggs of *A. kurodai* on the viability of RBL-2H3 cells. The following is same as Fig. 1.

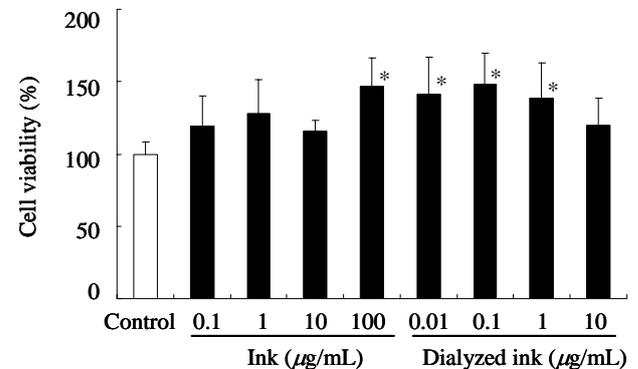


Fig. 3 Effects of ink of *A. kurodai* on the viability of RBL-2H3 cells. The following is same as Fig. 1.

結果及び考察

(1)細胞毒性の評価

アメフラシの冷水抽出物は、透析処理の有無にかかわらず 100 µg/mL で有意に細胞毒性を示した (Fig. 1)。また、卵の冷水抽出物は透析しないもので 10 µg/mL 以上、透析したものは 1 µg/mL 以上の濃度で有意な細胞毒性を示した (Fig. 2)。透析していない紫汁、アメフラシ及び卵のエタノール抽出物、アメフラシ及び卵のヘキササン抽出物では 100 µg/mL でも細胞毒性は示さなかった (Figs. 3, 4, 5)。透析した紫汁については 10 µg/mL までしか検討していないが、細胞毒性は示さなかった (Fig. 3)。これらの結果を踏まえ、抗アレルギー活性の評価は、アメフラシの冷水抽出物は 10 µg/mL、卵の冷水抽出物は 0.1 µg/mL、紫汁は 10 µg/mL、アメフラシ、卵のエタノール及びヘキササン抽出物は 100 µg/mL の濃度で行うこととした。

(2)抗アレルギー活性の評価

冷水抽出物について 2 回、エタノール抽出物及びヘキササン抽出物については各 1 回、IgE 抗体で感作した RBL-2H3 細胞を用いて脱顆粒刺激を行ったが、いずれも刺激による有意な脱顆粒反応が認められなかった (図示せず)。実験に用いた細胞数 (1.5×10⁵ cells/mL) が少なかったことや、抗原との反応時間 (20 分間) が短かったことなどから、明確な脱顆粒反応が起こらなかったのではないかと考えられる。今後これらの条件を見直し、再評価する必要がある。

そこで、冷水抽出物については A23187 で RBL-2H3 細胞の脱顆粒を促し抗アレルギー効果を評価した。その結果、透析したアメフラシ冷水抽出物、透析していない卵の冷水抽出物、及び透析した卵の冷水抽出物を添加した細胞で、β-ヘキソサミニダーゼ遊離率が有意に抑制された (Fig. 6)。よって、アメフラシ及び卵には、脱顆粒反応を抑制する作用を持つ水溶性の物質が含まれることが示された。さらに透析しても抑制作用が認められたことから、活性物質は分子量 14000 以上の高分子物質であることが示唆された。アメフラシの冷水抽出物は、透析前では有意な脱顆粒抑制作用を示さず、透析後に強い抑制作用を示した。この結果は、透析によって低分子物質が除去されることで抽出物中に占める脱顆粒抑制物質の割合が増したため、脱顆粒抑制作用が強まったものと考えられた。また、低分子の脱顆粒促進物質あるいは脱顆粒抑制作用に影響を与える物質が、透析によって除去された可能性も考えられる。一方、卵の冷水抽出物は、透析に関わらず強い脱顆粒抑制作用を示した。よって、卵は多量の脱顆粒抑制物質を含んでいる、もしくは強い

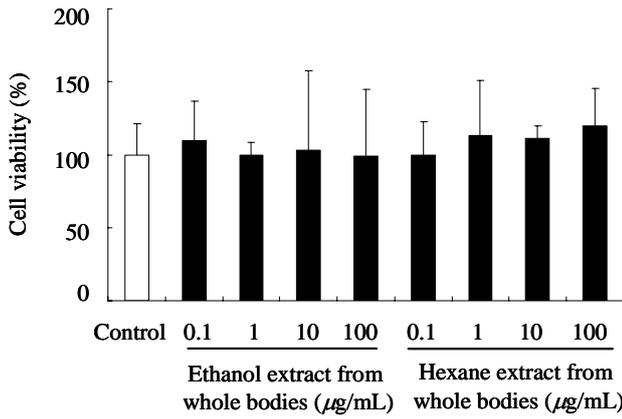


Fig. 4 Effects of ethanol or hexane extracts from whole bodies of *A. kurodai* on the viability of RBL-2H3 cells. The following is same as Fig. 1.

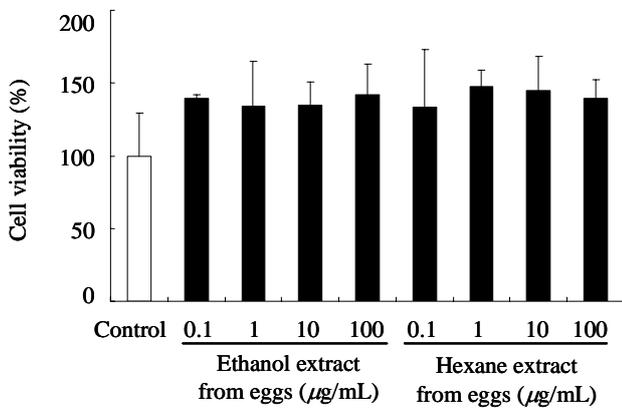


Fig. 5 Effects of ethanol or hexane extracts from eggs of *A. kurodai* on the viability of RBL-2H3 cells. The following is same as Fig. 1.

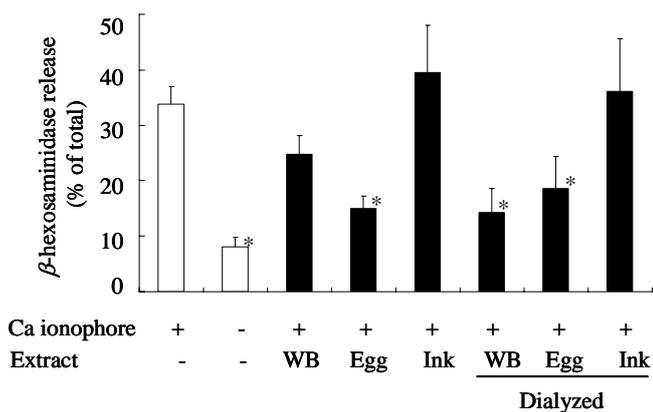


Fig. 6 In vitro anti-allergic activities of water extracts from whole bodies, eggs, and ink of *A. kurodai* on the release of β-hexosaminidase from RBL-2H3 cells. The cells were stimulated with 1 µM calcium ionophore (A23187) for 20 minutes with or without each extract. Each extract was treated at the highest concentration without cytolysis examined in WST-1 assay. Values are means ± SD, n=4. WB, whole body; *, Significantly different from the value for cells stimulated with calcium ionophore in the absence of each extract (Dunnett's test after one-way ANOVA, P<0.05).

作用を示す物質を含んでいると推定された。

今後は、アメフラシに含まれる脱顆粒抑制物質を特定して具体的な作用機序を解明し、動物実験等による効果の実証を進めることで、抗アレルギー剤として産業へ応用されることが期待される。

文 献

- 1) Kamiya H, Muramoto K, and Yamazaki M (1986) Aplysianin-A, an anti-bacterial and antineoplastic glycoprotein in the albumen gland of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Experimentia*, **42**, 1065-1067.
- 2) Yamazaki M (1993) Antitumor and antimicrobial glycoproteins from sea hares. *Comp. Biochem. Physiol., C*. **105**, 141-146.
- 3) Petzelt C, Joswig G, Stammer H, and Werner D (2002) Cytotoxic cyplasin of the sea hare, *Aplysia punctata*, cDNA cloning, and expression of bioactive recombinants in insect cells. *Neoplasia*, **4**, 49-59.
- 4) Hirata K, Muraoka S, Suenaga K, Kuroda T, Kato K, Tanaka H, Yamamoto M, Takata M, Yamada K, and Kigoshi H (2006) Structure basis for antitumor effect of Aplyronine A. *J. Mol. Biol.*, **356**(4), 945-954.
- 5) Butzke D, Machuy N, Thiede B, Hurwitz R, Goedert S, and Rudel T (2004) Hydrogen peroxide produced by *Aplysia* ink toxin kills tumor cells independent of apoptosis via peroxiredoxin I sensitive pathways. *Cell Death Differ.*, **11**, 608-617.
- 6) Ishiyama M, Shiga M, Sakamoto K, Mizoguchi M, and He P (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazon dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118-1122.