

ノート

ナマコに含まれる抗アレルギー活性成分の探索

寺内 正裕, 松尾 健, 豊田 安基江, 伊達 英代, 齋池 千恵子, 武藤 徳男*

Search for Anti-allergic Materials in Sea cucumber (*Stichopus japonicus*)

MASAHIRO TERAUCHI, TAKESHI MATSUO, AKIE TOYOTA, HIDEYO DATE, CHIEKO MOCHIIKE and NORIO MUTO*

(Received Sep. 28, 2007)

It was confirmed that the digestive tract of the sea cucumber (*Stichopus japonicus*) had antioxidant and anti-allergic activities. Also four components with inhibitory effects on hyaluronidase were separated from this echinoderm. This is the first treatise on the anti-allergic activity of the sea cucumber and the separation of active substances from the sea cucumber.

The salted gut of the digestive tract of sea cucumber, which is called "KONOWATA", has been prized as one of the delicious foods going well with Japanese sake since ancient times.

This study indicates that the sea cucumber could be utilized more as an ingredient of medicines, cosmetics and health foods.

Keywords: Sea cucumber, *Stichopus japonicus*, antioxidant activity, anti-allergic activity.

緒 言

ナマコは、棘皮動物門ナマコ綱に属する海生の動物の総称で、マナマコ科のマナマコ (*Stichopus japonicus*)、オキナマコ、キンコ科のキンコ、クロナマコ科のジャンメナマコ等がある。食用としてよく用いられるマナマコは、体色により、暗緑色のものは青ナマコ、黒色のものは黒ナマコ、栗色から褐色のものは赤ナマコと俗称で呼ばれ、特に赤ナマコは高級品とされる一方、黒ナマコは体色が黒く見た目が悪いため商品価値が低いとされている。広島県は全国でも有数の漁獲量を誇るナマコの産地であるが、近年、黒ナマコが漁獲量の多くを占めている。

著者らは、本県が実施している機能性食品開発プロジェクトの一環として、種々の動植物エキスの生理活性を調べていく過程で、ナマコが、抗アレルギー活性（ヒアルロニダーゼ阻害活性およびヒスタミン遊離抑制活性）を有することを見いだした。そこで、これまで捨てられていた黒ナマコの有効利用を目的に、ナマコに含まれる抗アレルギー活性成分の探索を行った。その結果、ナマコの消化管から強い抗アレルギー活性を有する4つのフラクションを得た。

実験の部

試薬及び機器

キサンチンオキシダーゼ（バターミルク由来5.87 U/mL）、ヒアルロン酸ナトリウム（微生物由来標品）、酸性ウシ血清アルブミン（ウシ由来結晶、BSA）はナカライテスク社製、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、ヒアルロニダーゼ（牛精子由来酵素320units/mg solid）、compound 48/80はシグマ アルドリッチ ジャパン社製、WST-1は同仁化学社製、ヒポキサンチン、ヘパリンは和光純薬工業社製を用いた。アミノ酸分析キットOPA試薬は島津製作所製、HPLC用の蒸留水、アセトニトリル、エタノール、メタノール、及びその他の試薬（特級）はシグマ アルドリッチ ジャパン社製を用いた。

また紫外可視吸光度計はUV-1600（島津製作所社製）、マイクロプレートリーダーはVersa max（Molecular devices社製）、HPLCはAgilent 1100、検出器；G1315A DAD（Agilent社製）及びLC-MS/MSはAPI3000（Applied Biosystems社製）を用いた。

実験材料

広島湾内で採取されたマナマコ (*Stichopus japonicus*) を、体色により、青ナマコ及び黒ナマコ（俗称）に選別した。これを、筋肉、消化管、生殖腺（卵巣、精巣）に

* 県立広島大学：Prefectural University of Hiroshima.

分け, それぞれ凍結乾燥後粉碎し試料とした. 実験に供した黒ナマコの重量をTable 1に示す.

活性測定用試料溶液の調製は, 各試料(乾燥)重量の10倍量の蒸留水を加え, 10分間超音波抽出した. この抽出液を, 予めメタノールと蒸留水で洗浄したSep-Pak Plus C18カートリッジカラム(Waters社製)に供し, 蒸留水3 mLで洗浄(脱塩)後, メタノール10mLで溶出し, このメタノール溶出液を試料溶液とした. この試料溶液を蒸留水で適宜希釈し, 各種活性測定(スクリーニングテスト)に供した.

抗アレルギー, 抗酸化活性の測定

各試料溶液について, 抗アレルギー活性はヒアルロニダーゼ阻害活性及びヒスタミン遊離抑制活性を, 前報[1]と同様の方法により測定した. また, 抗酸化活性はDPPHラジカル消去活性は前報[1]で, SOD(スーパーオキシドアニオン消去)活性は次の方法により測定した.

96穴平底アッセイプレートを用い, 50mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.4)を150 μ L, さらに3 mM EDTA, 3 mMヒポキサンチン, 1 mM WST-1の各試液を10 μ Lずつ加え混合した. これに試料溶液を10 μ L添加混合した後, 100mU/mLキサンチンオキシダーゼを10 μ L加え, プレートミキサーでよく攪拌し, 室温で10分間インキュベートした. これをプレートリーダー(VERSA max, Molecular Devices社製)で測定し, 415nmにおける吸光度(O.D. 415)を求めた. 対照には試料溶液の代わりに蒸留水を用いた. また, キサンチンオキシダーゼの代わりに蒸留水を加えたものをブランクとした.

SOD活性は, 次の式で求められる消去率(%)で表した.

$$\text{消去率}(\%) = \{(B-A)/(B-C)\} \times 100$$

A: 試料溶液のO.D. 415, B: 対照のO.D. 415

C: ブランクのO.D. 415

活性成分の探索

先に実施したスクリーニングテストにより, ナマコの消化管が強い抗アレルギー活性を有することが明らかとなった. そこでナマコの消化管35gをエタノール1 Lで一昼夜冷浸抽出後, 抽出液をろ過した. 残渣にさらにエタノールを加え同様な操作を2回行い, 抽出液を合わせ,

減圧下で溶媒を留去してナマコの消化管のエタノールエキス9.5gを得た. このエタノールエキスを水100mLに懸濁し, ジエチルエーテル, 酢酸エチル, n-ブタノールの各水飽和溶媒で順次抽出した. それぞれの抽出液を減圧下で溶媒を留去し, ジエチルエーテル画分(Et₂O fr.) 3.6g, 酢酸エチル画分(AcOEt fr.) 0.77g, n-ブタノール画分(BuOH fr.) 0.93g, 水画分(H₂O fr.) 4.1gを得た. 次に, ジエチルエーテル画分(3.6g)及び酢酸エチル画分(0.77g)を合わせ, 水で懸濁後, 予めアセトニトリルと蒸留水で洗浄したVarian Mega Bond Elut C18 10g 60mL (GL-サイエンス社製)カラムに供し, 水50mLで洗浄(脱塩)後, 20%, 40%, 60%, 80%及び100%アセトニトリル溶液50mLで順次溶出した. この溶出液のうち40~100%アセトニトリル溶出液でそれぞれ高いヒアルロニダーゼ阻害活性を認めたので, 各溶出液をpreparative silica gel 60 F₂₅₄S (Merck社製)薄層クロマトグラフィー(移動層;クロロホルム:メタノール:水 65:16:2)で疎分画し, 活性の強いフラクションを掻き取り, HPLC〔カラム;YMC-Pack Pro C18 AS-342 (S-10 μ m, 12nm, 150mm \times 20mm I.D), 移動層;アセトニトリル:0.1%ギ酸:(80:20), 流速;10mL/min, 検出波長;200nm〕による精製を行い, 40%及び60%アセトニトリル溶出液からfr 1を, また60%, 80%及び100%アセトニトリル溶出液からfr 2, 3及び4を分取した. (Fig. 1)

結果と考察

黒ナマコの活性成分

ナマコの筋肉, 消化管, 及び生殖腺(卵巣, 精巣)の水抽出液を用いて抗酸化及び抗アレルギー活性のスクリーニングテストを行った. その結果, Table 2に示すとおり, 抗酸化活性は, ナマコの各部位いずれもSOD活性のみが見られ, 卵巣が最も強く次いで消化管, 精巣, 筋肉の順であった. また, 抗アレルギー活性は, 筋肉, 消化管, 及び精巣にヒアルロニダーゼ阻害活性がみられた. しかしヒスタミン遊離抑制活性を示したのは消化管のみであった. なお, 青ナマコ, 黒ナマコで活性の強さに差はみられなかった.

そこで, 消化管の抗アレルギー活性について, 更に検討することにした.

Table 1 Weight of Various Parts of "Kuro-Namako"

part	weight (g)	
	fresh	dried*)
body	9207	528
digestive tract	355	35
testis	300	17
ovary	380	41

*) : by freeze drying method

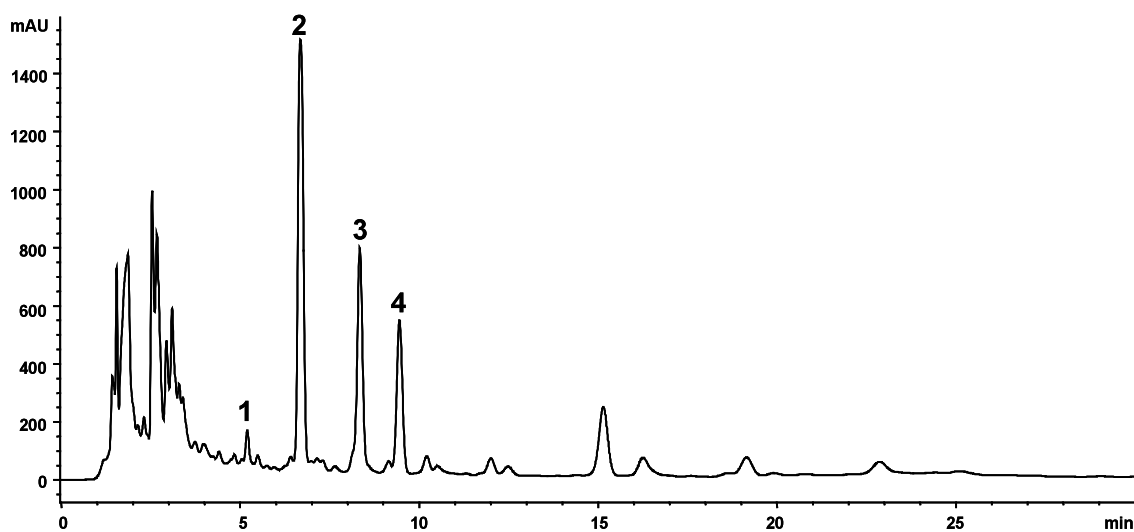


Fig.1 HPLC Chromatogram of Et₂O fr.

HPLC conditions (Agilent HP1100)

column: YMC-Pack Pro C18 150×4.6 mm i.d.

column temp.: 40°C

mobile phase: CH₃CN: 0.1% HCOOH (80: 20)

flow rate: 1mL/min

detector: UV 210 nm

Table 2 Inhibitory Effects of "Kuro-Namako" (Various Parts) on Oxidation and Allergic activity

part	Inhibition			
	Oxidation		Allergic activity	
	DPPH ^{a)} 100mg/mL (%)	SOD ^{b)} 10mg/mL (%)	Hyaluronidase ^{c)} 50mg/mL (%)	Histamine ^{d)} (IC ₅₀ , mg/mL)
body	—	58.5	47.1	—
digestive tract	—	87.4	86.5	10.4~14.5
testis	—	79.4	37.0	—
ovary	—	92.1	—	—

a) Radical scavenging effects on DPPH radical

b) Superoxide dismutase activity, measured by SOD Assay kit (WST)

c) Inhibitory effects on hyaluronidase

d) Inhibitory effects on compound 48/80-induced histamine release from peritoneal mast cell of rats.

Table 3 Inhibitory Effect of Each Fraction on Allergic activity (Hyaluronidase)

Fraction	Inhibition (%) (1 mg/mL)
Et ₂ O fr.	109.0
AcOEt fr.	78.8
BuOH fr.	29.3
H ₂ O fr.	—

Table 4 Inhibitory Effects of Compound 1, 2, 3 and 4 on Hyaluronidase

Compound	Inhibition (%) (100µg/mL)
1	67.9
2	91.6
3	81.1
4	88.0

消化管のエタノールエキスをジエチルエーテル, 酢酸エチル, n-ブタノール及び水を用いて分画し, 各画分について各活性を測定した結果, Table 3に示すとおりジエチルエーテル及び酢酸エチル画分が強い抗酸化活性及びヒアルロニダーゼ阻害活性を有することが明らかとなった。

このジエチルエーテル及び酢酸エチル画分について, ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定を行いながら各種クロマトグラフィーによる精製を繰り返し, 最も活性の強い

フラクションから, 4種の化合物1 (m/z: 301, 約5 mg), 2 (m/z: 303, 約4 mg), 3 (m/z: 329, 約2 mg) 及び4 (m/z: 305, 約1 mg) を分取した (Table 4)。しかし4種の化合物はいずれも少量しか分取できず精製も不十分であったため, 構造決定には至らなかった。

まとめ

ナマコの消化管に, 強いヒアルロニダーゼ阻害活性及

び抗酸化活性 (SOD活性) を有する事を明かにした。この消化管から4種のヒアルロニダーゼ阻害活性を有する化合物を分取したが、分取量が少なくまた精製が不十分であるため構造決定には至らなかった。しかし、ナマコが抗アレルギー活性を有することや、ナマコの消化管からの活性物質の分取はこれまで報告されておらず、著者らが初めてである。

ナマコの消化管の塩辛は“コノワタ”と称し、古くから酒の肴として珍重されているが、抗アレルギー活性を有することで、医薬品・化粧品や機能性食品の原料等として、さらなる有効活用が期待される。

謝 辞

本研究に際し、大量のナマコをご提供頂きましたくば漁業協同組合長、ヒスタミン遊離抑制活性の測定をして頂きました食品工業技術センター 柴田賢哉研究員ならびに、種々の助言を賜りました広島国際大学薬学部 笠井良次教授、金子哲夫講師に深謝致します。

参 考 文 献

- [1] 寺内正裕, 松尾 健, 豊田安基江, 金森久幸, 柴田賢哉, 藤原朋子, 甲村浩之, 伊藤栄治, 中津沙弥香, 武藤徳男. 生薬学雑誌, 61(1), 18-23, 2007.