

## 褐藻に含まれるカロテノイドの腫瘍細胞に対する増殖抑制効果

田中彰, 太田智樹, 吉川修司, 錦織孝史

## Antiproliferative effect of carotenoids from brown algae on cancer cells

Akira Tanaka, Tomoki Ohta, Shuji Yoshikawa and Takafumi Nishikiori

The antiproliferative effect of a carotenoid-containing extract from the brown algae, *Costaria costata* (Sujime) and *Alaria praelonga* (Ainu-wakame) was investigated using cultured cancer cells. The carotenoids of 'Sujime' and 'Ainu-wakame' were mainly composed of fucoxanthin. The carotenoid fraction suppressed cell growth in HL-60 cells considerably in a dose-dependent manner, but only slightly in MKN-45 cells. Furthermore, these fractions suppressed cell growth in WI-38 VA13 cells that transformed fibroblast WI-38 cells, considerably in a dose-dependent manner, but not in WI-38 cells. These results suggest that the carotenoid fraction containing mainly fucoxanthin from 'Sujime' and 'Ainu-wakame' has selective antiproliferative properties.

カロテノイド色素は陸上植物や動物, 細菌類に至るまでの広い範囲に多種多様に存在し, これまで, 構造が決定されているものだけでも700種類以上にも及ぶ<sup>1)</sup>. 食品に含まれるカロテノイド色素として,  $\beta$ -カロテンやリコペン,  $\beta$ -クリプトキサンチンなどが知られており, 抗酸化活性や抗腫瘍活性などの生体調節機能があることが報告されている<sup>2) 3) 4) 5)</sup>. 近年, 健康の維持や生活習慣病の予防に関心が高まる中, カロテノイド色素を多く含む野菜や果物が, 錠剤やソフトカプセルなどのサプリメントへの加工利用など, 機能性食品として関心が高まっている. 水産物にはカロテノイドとしてフコキサンチンやアスタキサンチンが含まれることが知られている<sup>1) 6)</sup>. フコキサンチンはワカメやヒジキなどの褐藻類に含まれ, 抗酸化および抗腫瘍活性があることが報告されている<sup>7) 8) 9) 10) 11)</sup>. 北海道にはコンブなどの褐藻類が豊富に存在しているが, これまで, そのカロテノイド色素について分析された例はほとんど見当たらない. コンブは北海道の主要な水産資源であるが, 食品としての利用用途は「だし」用としての葉売りや佃煮などの簡易な加工利用にとどまり, 需要や価格が伸び悩んでいる. ま

た, スジメやアイヌワカメなどの褐藻類は食材としての利用が見込めないことから, 豊富に存在することが確認されているものの, ほとんど活用されていない. その一方で, ガゴメコンブはあまり活用していなかったが, 抗腫瘍効果があると言われているフコイダンを多く含むことから注目され, これを原料とした健康食品が数多く開発され, ガゴメコンブの需要は急速に拡大している. このように, 食品素材としての利用価値を高めるためには, 健康を調節する機能が1つの重要なキーポイントになると考えられる. 本研究では, これまでほとんど利用されていない褐藻である, スジメ (*Costaria costata*) とアイヌワカメ (*Alaria praelonga*) のカロテノイド色素の組成と含量を明らかにし, さらに培養動物細胞を用いた実験系によって抗腫瘍効果に対する評価を行った.

## 実験方法

## 1. 試薬および試料

実験に使用したスジメおよびアイヌワカメは北海道東部太平洋沿岸(根室市歯舞)で採取し,  $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した. 室温で解凍後, それぞれの海藻を約2 cm角に

細切して実験試料とした。

試薬は特級を用い、エタノール、アセトニトリル、メタノール、ヘキサン、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、石油エーテル、無水硫酸ナトリウムは関東化学(株)製、 $\beta$ -カロテンは和光純薬工業(株)製、フコキサンチンはDHI Water&Environment製を用いた。RPMI1640培地、DMEM培地はGIBCO製、ウシ胎児血清は三光純薬(株)製を用いた。

## 2. カロテノイド色素の分析

スジメおよびアイヌワカメの総カロテノイド量を調べるために、総色素を抽出した。すなわち、実験試料にカロテノイドの酸化分解を抑えるために試料重量の10%量のピロガロールを添加し、エタノールを加えて磨砕し、吸引ろ過して色素抽出液を得た。この操作を抽出液に色が着かなくなるまで繰り返し、抽出液を集めて定容した。0.45 $\mu$ mのフィルターを通した後、HPLC (SHIMADZU Class-VP)を用いて分析を行った。HPLCの分析条件は次のとおりに行った。分離カラムはInertsil ODS-3 ( $\phi$  4.6mm  $\times$  250mm)を用いた。移動相にはアセトニトリル、メタノール、*n*-ヘキサンおよびジクロロメタンの混合溶液を用い、A液の組成が85:10:2.5:2.5、B液が45:10:22.5:22.5となるように調製した。0.7ml/minの条件で、0分から10分は100% A液、10分から40分まで連続濃度勾配でB液濃度を100%まで上げ、40分から45分まで100% B液で溶出した。検出器にはフォトダイオードアレイ検出器を用いた。カロテノイド色素の検出には波長470nmにおける溶出曲線を用い、得られたピークの300から700nmにおける吸収スペクトルを標準試薬と比較してカロテノイドの同定を行った。フコキサンチンおよび $\beta$ -カロテンの含有量は標準溶液の濃度から算出した。

## 3. カロテノイド画分の調製

細切した試料に20倍量の70% (v/v) メタノールを加え、4℃の暗所で一夜静置した。ろ紙No.5Aで吸引ろ過し、ろ液を集めた。残渣に再び70%メタノールを加えて同様の操作を繰り返した。得られたろ液を分液漏斗に移し、等量のジエチルエーテルを加え、混和して2層に分かれるまで蒸留水を加えた。下層を捨て、エーテル層を数回蒸留水で洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水後、エーテル層を蒸発乾固した。さらに石油エーテルを加えて抽出物を再溶解し、等量の84% (v/v) メタノールを加えて混和した。上層を取り除き、下層に等量のジエチルエーテルを加えて混和し、2層に分離するまで蒸留水を加えた。下層を捨て、上層を数回蒸留水で洗い、無水

硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下でエーテルを除去してカロテノイド画分を得た。画分に少量のエタノール(終濃度として0.1%以下)を加えて溶解させた。培養に使用する培地を用い、試料濃度として125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu$ g-試料重量/ml(培養細胞系への添加時の終濃度として12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu$ g/ml)となるように調製した。

## 4. 抗腫瘍性の評価

抗腫瘍性の評価は、ヒト由来のMKN-45(胃低分化型腺ガン)、HL-60(急性前骨髄性白血病)、WI-38(肺由来正常2倍体線維芽細胞)、WI-38VA13(WI-38細胞をSV40ウイルスで形質転換させた細胞株)を用いた。培養に使用した培地はMKN-45およびHL-60細胞株の場合にはRPMI1640培地、他の細胞ではDMEM培地(L-グルタミン含有)を用い、これらに血清として非働化したウシ胎児血清(FBS)を10% (v/v)、抗生物質としてストレプトマイシンおよびペニシリンをそれぞれ、100 $\mu$ g/ml, 100IU/mlとなるように加えて調製した。培地に各細胞を $5 \times 10^4$  cells/mlの濃度に懸濁させて、96wellセルカルチャープレートに100 $\mu$ l/wellずつ播種し、37℃, 5% CO<sub>2</sub>-95% air, 湿潤状態の雰囲気下の恒温器内で24時間前培養した。前培養した細胞に、培地に溶解させた色素抽出物を10 $\mu$ lずつ添加し、再び恒温器内で48時間培養した。生存細胞数はWST-8 (DOJINDO Cell-Counting Kit-8)を用いる比色法で測定した。すなわち、450nmでの吸光度をプレートリーダー(BIO RAD Benchmark)で測定した。試料の代わりに0.1%エタノールを添加した時の吸光度(コントロール)に対する相対値を生残率として示した。

## 結果および考察

### 1. カロテノイド色素の組成と含量

図1にエタノール抽出により得られたカロテノイド色素のHPLCでの溶出パターンを示す。スジメ、アイヌワカメともに6分過ぎに主要なピークが見られ、標準物質の溶出時間および吸収スペクトルとの比較からフコキサンチンであると推察された。スジメには $\beta$ -カロテンと推測されるピークも認められた。他にいくつかのピークが検出されたが、吸収スペクトルからクロロフィルと推定され、カロテノイド色素はこれらの他には認められなかった。表1にカロテノイドの含有量と組成を示す。スジメは乾物100g当たり47.1mg, アイヌワカメは36.5mgであった。スジメに含まれていた $\beta$ -カロテンは0.74mgであり、組成比としてはわずかであった。こ

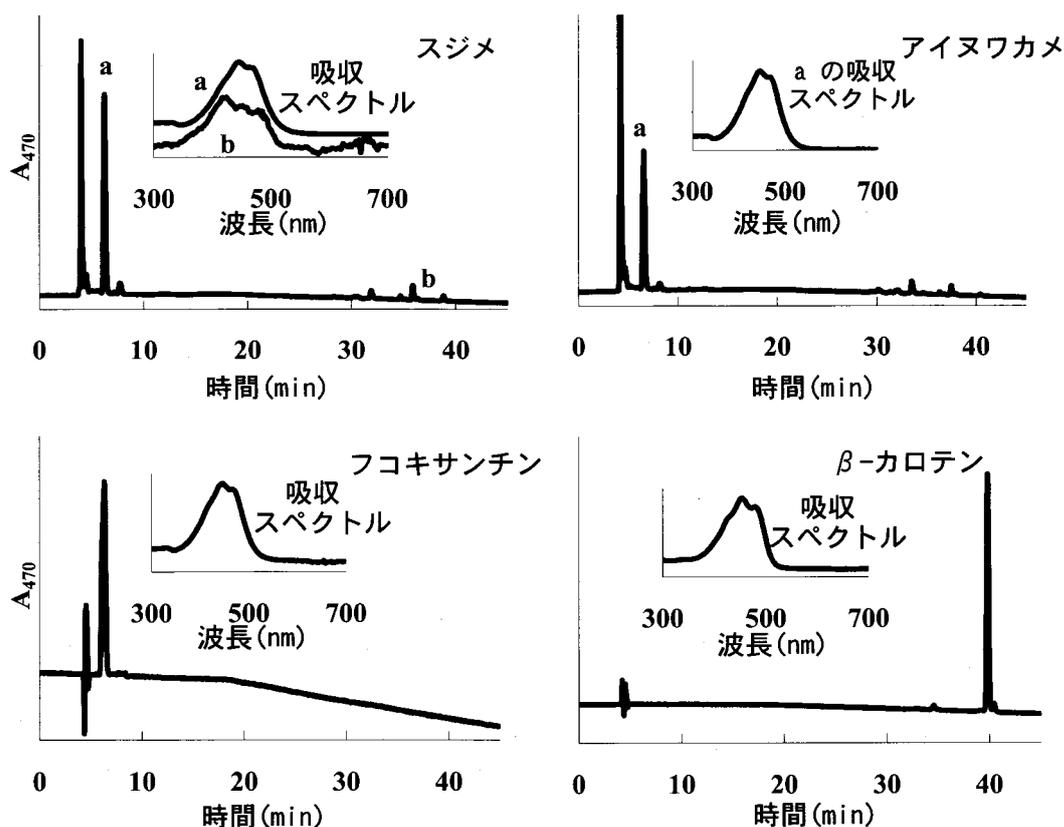


図1 HPLCにおけるエタノール抽出物および標準品の溶出パターン

表1 スジメおよびアイヌワカメのカロテノイド含量と組成比

	カロテノイド総量 (mg/100g・乾物重量)	組成比(%)	
		フコキサンチン	β-カロテン
スジメ	47.9	98.5	1.5
アイヌワカメ	36.5	100.0	n.d.

n.d.: 検出されず

の結果から、スジメおよびアイヌワカメに含まれているカロテノイド色素はほとんどがフコキサンチンであることが推測された。これまで、フコキサンチンの含有量を報告している文献は見当たらないが、緑黄色野菜に含まれるβ-カロテン含量はニンジンで乾物100g当たり約80mg、ホウレンソウで約45mgであり、カロテノイド含量として比較した場合、2つの褐藻は緑黄色野菜に匹敵するカロテノイドを含んでいることが明らかになった。

## 2. 培養動物細胞系を用いた抗腫瘍性の評価

表2に各培養細胞株にカロテノイド画分を終濃度が100μg/mlとなるように加えた時の生残率を示す。スジメのカロテノイド画分を添加した場合、MKN-45および

HL-60の細胞生残率はそれぞれ、97.3%および17.8%であり、HL-60の生残率をより大きく低下させた。また、アイヌワカメの画分の場合も、MKN-45およびHL-60の細胞生残率はそれぞれ、84.2%および30.1%であり、同様に、HL-60の生残率をより大きく低下させた。これらの結果は標準品のβ-カロテンを添加した場合と同程度であった。MKN-45とHL-60は同じヒト腫瘍由来の細胞株であるが、カロテノイド画分を添加した場合の生残率は大きく異なり、浮遊細胞であるHL-60の生残率をより大きく低下させた。細川らは、ワカメから抽出精製したフコキサンチンを用いてHL-60に対する増殖抑制効果を調べており、45.2μMの濃度で生残率が17.3%に低下したと報告している<sup>7)</sup>。本試験では、同じ生残率

表2 各種細胞株の生残率に対するスジメおよびアイヌワカメのカロテノイド画分の影響 (%)

	起源および性質	形態	スジメ	アイヌワカメ	$\beta$ -カロテン
MKN-45	胃ガン	接着 上皮様	97.3	84.2	103.6
HL-60	前骨髄性白血病	浮遊 球形	17.8	30.1	22.8
WI-38VA13	WI-38株を形質転換	接着 上皮様	42.5	78.6	44.3
WI-38	肺 正常2倍体	接着 線維芽	101.6	97.9	95.3

各細胞 (5×10<sup>3</sup>cells/Well) を24時間前培養し、色素画分を終濃度100 $\mu$ g/mlとなるように添加し、48時間培養した。生存細胞数をWST-8キットにより計測し、抽出物無添加のコントロールに対する相対値 (生残率) として表した。対照カロテノイド標品としての $\beta$ -カロテンのデータも記載した。

を示すには3倍ほど高い濃度が必要であったが、使用した画分が粗抽出物であるためと推測され、効果としては細川らの結果に一致すると考えられた。一方、接着細胞である胃ガン由来のMKN-45の生残率は小さな低下に止まった。MKN-45は培養すると胃の上皮細胞と類似した性質を示す。胃の上皮は粘液を分泌して粘膜層を形成し、胃液などから細胞を保護している。MKN-45も同じ性質があり、被験物が直接細胞と接触するのを当該粘液物質が妨げている可能性が考えられた。

WI-38VA13では、スジメの画分で42.5%と生残率の低下が見られたが、アイヌワカメでは78.6%と生残率は小さな低下に止まった。WI-38では、スジメ、アイヌワカメともに生残率はほとんど低下しなかった。WI-38細胞はヒト胎児肺由来の細胞株で有限増殖性を示し、正常な細胞に近い性質を持つ。これにSV40ウイルスで形質転換させたのがWI-38VA13細胞株であり、無限増殖が可能な悪性化した細胞株とされている。この結果から、スジメおよびアイヌワカメのカロテノイド画分に正常細胞の生残率に影響を与えず、悪性化した細胞の生残率をより大きく低下させる効果があることが示された。奥隅は異なる細胞株で、フコキサンチンが正常細胞よりも悪性化した細胞株の増殖を抑制することを報告しており<sup>9)</sup>、本結果は奥隅の報告と良く一致するものであった。

図2に各培養細胞株生残率のカロテノイド画分濃度依存性を示す。MKN-45では、スジメの場合100 $\mu$ g/mlまでは生残率が100%であったが、200 $\mu$ g/mlで36.3%となり、濃度が高いと生残率が低下した。アイヌワカメでは、濃度依存的に低下しているのが認められ、200 $\mu$ g/mlで61.4%となった。また、HL-60では、スジメ、アイヌワカメいずれの場合にも生残率は100 $\mu$ g/mlまで濃度依存的に低下し、200 $\mu$ g/ml濃度ではスジメ、アイヌワカメともに、生残率は数%にまで低下した。WI-38VA13ではスジメ、アイヌワカメともに25 $\mu$ g/ml以

上の濃度で生残率は濃度依存的に低下し、スジメの方がアイヌワカメよりも大きく生残率を低下させていた。WI-38では、スジメ、アイヌワカメともに100 $\mu$ g/ml以下の濃度では、生残率はほぼ100%となったが、200 $\mu$ g/mlでは、スジメが40.3%と生残率が低下したのに対し、アイヌワカメは91.4%とほとんど生残率の低下は見られなかった。本結果では、カロテノイド画分は腫瘍由来の細胞および悪性化した細胞に対しては、濃度依存的に生残率を低下させ、正常細胞に対しては100 $\mu$ g/mlまでは生残率を低下させないことが示された。生残率の低下が、細胞の増殖抑制作用によるものか、致死作用によるものか本試験結果からは判断できないが、細川らはフコキサンチンの抗腫瘍効果がアポトーシスにより細胞死を誘導していると報告している<sup>7)</sup>。本結果も同様にアポトーシスにより生残率を低下させたものと推測された。フコキサンチンの抗腫瘍作用として、発癌や増殖を抑制する作用があることも報告されており<sup>9) 10) 12)</sup>、癌の予防や治療の両方において大きな効果があると期待されている。本研究で得られた結果から、スジメ、アイヌワカメに含まれるカロテノイド画分に対してもこれらの効果が期待された。

## 要 約

スジメおよびアイヌワカメに含まれているカロテノイド色素の腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用について検討した。両褐藻の主要カロテノイド色素はフコキサンチンと推測された。これらの褐藻から得られたカロテノイド抽出画分はHL-60細胞の生残率を大きく低下させた。また、正常細胞のWI-38の生残率には影響を与えず、悪性化したWI-38VA13の生残率を低下させたことから、スジメおよびアイヌワカメのカロテノイド画分に抗腫瘍効果が期待された。

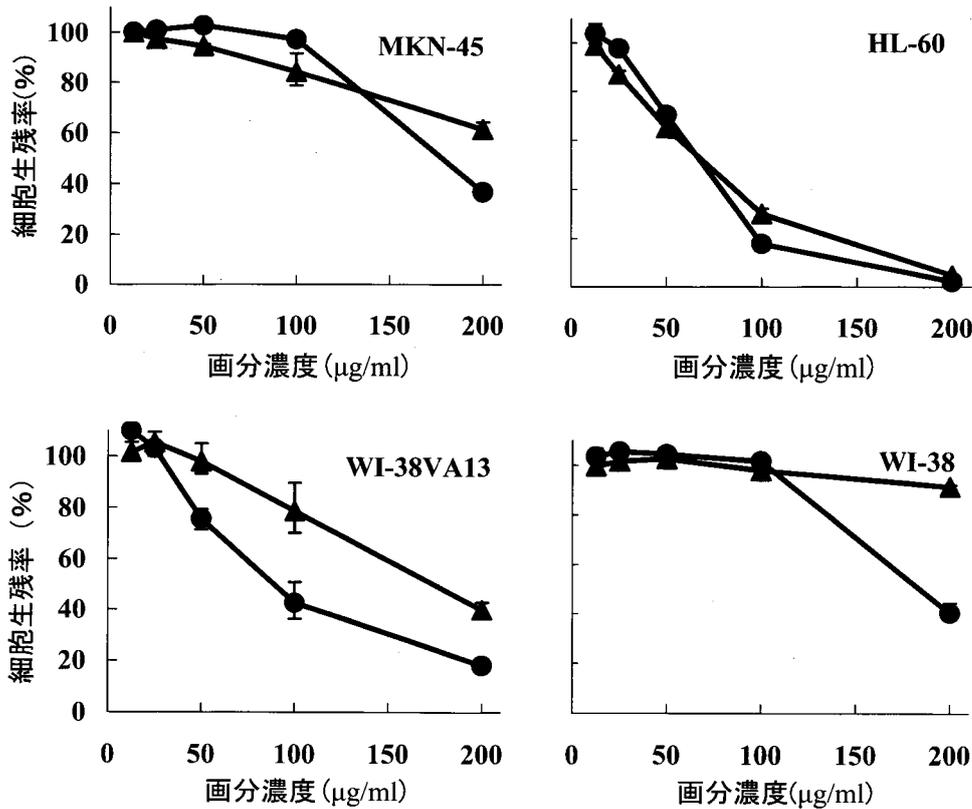


図2 細胞生残率のカロテノイド画分濃度依存性

●:スジメ ▲:アイヌワカメ

各細胞 (5 × 10<sup>3</sup> cells/Well) を24時間前培養し、色素画分をそれぞれ、終濃度12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mlとなるように添加し、48時間培養した。細胞生残率は表2と同様に算出した。

文 献

- 高市真一, カロテノイド, 「カロテノイドーその多様性と生理活性ー」, 第1版, 高市真一編, (裳華房, 東京), pp.1-20 (2006).
- 西野輔翼, 食品中のカロテノイドによる発癌抑制, 農化 67, 39-41 (1993).
- 呂毅, 衛藤英男, 機能が注目されるカロテノイドーリコピンー, 月刊フードケミカル, 1995-3, 38-43 (1995).
- 川井悟, カンキツ類のがん抑制成分, 化学と生物, 39, 795-802 (2001).
- 富田純史, 動物における機能と生理活性, 「カロテノイドーその多様性と生理活性ー」, 第1版, 高市真一編, (裳華房, 東京), pp.67-86 (2006).
- 三室守, 加藤哲也, 藻類における生理機能, 「海洋生物のカロテノイドー代謝と生物活性ー」, 幹渉編, (恒星社厚生閣, 東京), pp.87-96 (1993).
- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S. and Takahashi, K., Apoptosis-inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60, *Food Sci. Technol. Res.* 5, 243-246 (1999).
- 広田望, 鹿山光, 上岡薫, 熊谷晶子, ヒジキのクロロフィルータンパク質複合体の分離と色素組成, 日水誌, 55, 1961-1969 (1989).
- Okuzumi, J., Antiproliferative and antitumor promoting activities of fucoxanthin, a natural carotenoid, *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, 100, 551-566 (1991).
- Satomi, Y., Tokuda, H., Fujii, H., Shimidzu, N., Tanaka, Y. and Nishino, H., Anti-tumor-promoting activity of fucoxanthin, a natural carotenoid, *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, 105, 739-743 (1996).

- 
- 11) Yan,X.,Chuda,Y.,Suzuki,M. and Nagata T.,Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed,*Biosci.Biotechnol. Biochem.*,63,605-607 (1999).
- 12) Kotake-Nara,E., Kushiro,M., Zhang,H., Sugawara,T., Miyashita,K., Nagao,A., Carotenoids Affect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells,*J. Nutr.*,131,3303-3306 (2001).