



## る浮腫の抑制

関節に炎症が生じたときに見られる、発赤、腫脹、熱感、疼痛はプロスタグランジンE2 (PGE2)によって起こることが確かめられている。

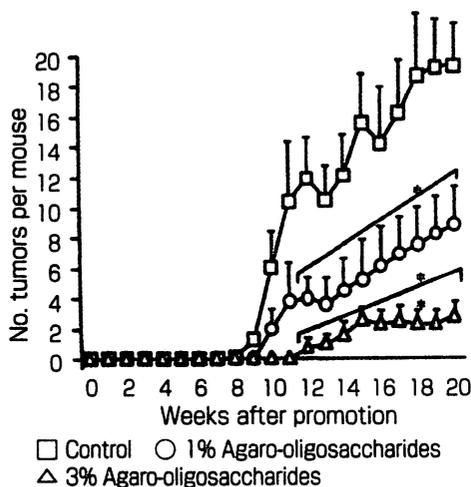
マウスのマクロファージ株細胞RAW264.7をアガロヘキサオース存在下で5時間培養後、LPSでPGE2を誘導し、18時間後にその量を測定すると、PGE2量がコントロールの約20%にまで低下していた。アガロオリゴ糖はシクロオキシゲナーゼを阻害せず、何らかのまだ知られていない新しい経路を通じてPGE2産生を抑えているものと考えられる<sup>3)</sup>。

ホルボールエステル的一种であるTPAは細胞リン脂質代謝を亢進させ、発ガンプロモーションにつながる重要な作用を持っている。この発ガン促進剤であるTPAをマウスの耳に塗布すると浮腫が誘発されるが、TPA塗布の14日前から10%アガロオリゴ糖を経口で摂取させるか耳に塗布することによって浮腫の形成が抑制されることが明らかとなった。また、マウスに100 µgの発癌剤DMBAを与えた後、1週間後から背部皮膚に1 µgのTPAを20週間にわたって、1週間に2回の割合で塗布し続け乳頭腫を発生させるという動物モデルにおいてアガロオリゴ糖の効果を調べた。アガロオリゴ糖の濃度は0, 1, 及び3%とし、DMBA投与1週間前から飲料水として自由摂取させた。その結果3%群の場合、コントロールの水群に対して、乳頭腫の発生数は約10%にまで減少していた(図2)。

## 一酸化炭素(CO)の産生増強作用

### (1) 抗酸化物質としてのCO産生

生体内ではヘムオキシゲナーゼ(HO)によってヘムが異化作用を受け、等モルの一酸化炭素(CO)、ビリルビンおよび鉄が産生される。HOにはNOSと同様に3種類のアイソフォームがあり、HO-2とHO-3は構造型であるが、HO-1は誘導型で強力な抗炎症作用を示すだけでなく、過酸化水素、紫外線、高酸素血などの酸化的なストレスによって強く誘導され、生体を保護するように働く。また、重金属、様々なサイトカイン、



Data show mean±SEM of 10 animals.  
\*: $p < 0.05$ , \*\*: $p < 0.01$  vs control

図2 アガロオリゴ糖による発ガン予防作用

ホルモン、エンドトキシン、熱ショックなどによって誘導される。つまり、オキシダントによる細胞や組織の障害から細胞を守り、恒常性を維持するために働いているものと考えられている。HO-1の遺伝子をアデノウイルスベクターでラットの肺に導入してやると、 $>99\%$   $O_2$ の条件下においても肺の傷害を防ぐことができた。結局、酸化的ストレスから細胞を守る仕組みは、ヘムの異化作用によって出現する主産物のCOをはじめ、ビリルビンやフェリチンなどの抗酸化分子の働きによるものと考えられる。

### (2) 誘導型一酸化炭素産生酵素(HO-1)の発現増強作用

一酸化炭素産生酵素と書いたが、ヘムオキシゲナーゼのことである。マクロファージ株細胞RAW264.7は培養液のみの条件下では12時間、HO-1を全く発現しなかった。一方、LPS単独かLPSとIFN- $\gamma$ で処理すると微かなHO-1の発現が見られるだけであるが、アガロピオースを添加すると濃度依存的にHO-1の発現が認められた<sup>4)</sup>。この発現は、LPSにより誘導されたNOによる酸化的ストレスとアガロピオースとの共同作用によるものと考えられる。一方、HO-1と同様のストレス応答タンパク質であるHSP-70やGRP-78などは何の影響も受けておらず、HO-1の発現のみに対する特異的な作用であると考えられる。

### (3) 神経細胞の遺伝子転写をCOは制御する

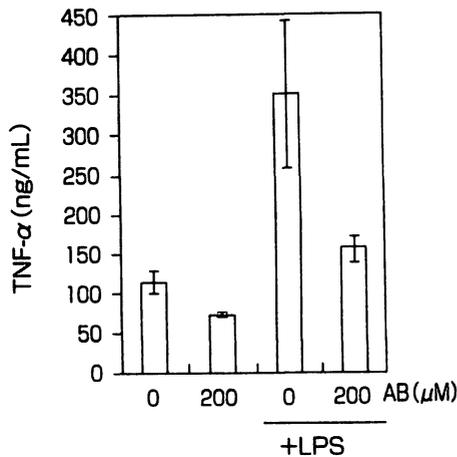
炎症反応の制御と言う観点からNOとCO産生の制御について述べてきたが、最近、NOとCOは神経伝達物質として大きな役割を果たしていることが、明らかとなってきた。NOとCOは可溶性のグアニリルシクラーゼのヘム部分に結合し、この酵素を活性化させる。この活性化された酵素は、第二の情報伝達分子であるcGMP (グアノシン3',5'-モノリン酸)を増加させて、神経細胞間の伝達を行っている。

一方、神経細胞においてはグアニリルシクラーゼと同様にヘムをもった神経細胞の転写因子NPAS2タンパク質と結合して、転写活性を制御していることが明らかとなってきた<sup>5)</sup>。つまり、COは神経細胞の長期的変化つまり記憶や学習能力さらにはサーカディアンリズムにも関与している可能性があると考えられはじめた。

## TNF- $\alpha$ 産生抑制作用

病院の入院患者にとって、敗血症は死因の最大のものである事はあまり知られていない。感染菌そのものに因って死ぬのではなく、誘導されたNOによって引き起こされる血管拡張による急激な血圧低下やTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、マクロファージ炎症タンパク質MIP-1 $\beta$ などの炎症惹起性サイトカインやケモカインがコントロール不能な量産生され、白血球の増大、末梢血管の漏えい、組織の破壊などが起こり、死に至るのである。

敗血症の主な引き金になるLPSはグラム陰性菌の細胞壁構成成分のひとつで、これをマウスやマクロファージに投与すると、敗血症と同様の激しい症状が表れる。しかし、しばらく時間が経過すると、IL-10やIL-4のような抗炎症サイトカインが現れはじめて、炎症を引き起こすサイトカインやケモ



Data show mean  $\pm$  SE of 3 wells.

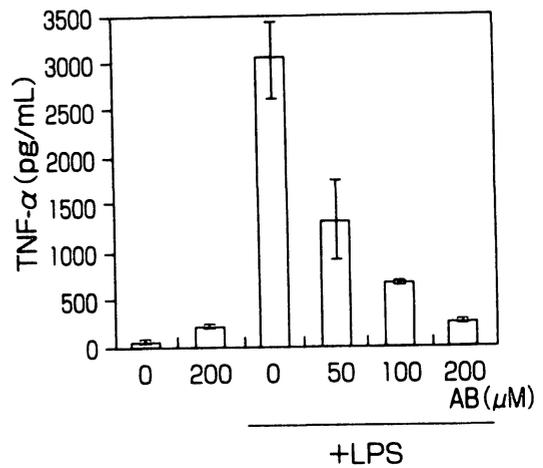
図3 アガロビオースがマウス腹腔マクロファージのTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響

カインの合成を阻害して炎症を収めるように働き始める。

マクロファージ株細胞(RAW264.7)をLPSで処理すると、当然TNF- $\alpha$ が産生され始める。Choiらはマクロファージ株細胞が、HO-1を遺伝子組換えで大量発現するようにしておいた後にLPSを与える実験をおこなったところ、TNF- $\alpha$ の産生量はHO-1を発現していないマクロファージ株細胞の約1/5であることを示した<sup>9)</sup>。つまり、HO-1はTNF- $\alpha$ の産生を大きく抑制することが明らかとなった。さらに気体のCO存在下でマクロファージ株細胞に微量のLPSを作用させると、TNF- $\alpha$ の産生量は添加したCOの濃度に依存して低下することが示された。これらの結果は、マウスを使った *in vivo* の実験でも確認された。

次に、ChoiらはNOSの特異的な阻害剤L-NAMEを与えてNOの産生を止めた状態にしておいて、COの有無でLPSによって誘導されるTNF- $\alpha$ の量を調べたところ、L-NAMEがない場合とほぼ同様の結果が得られた。また、LPSによって誘導されるNOの産生量もCOの存在の影響は受けず、TNF- $\alpha$ 産生抑制はCOがNOの関連経路に影響を与えた結果ではないことが明らかとなった。

筆者らは、寒天加水分解物水溶液(1%及び10%)をマウスに飲水として19日間自由摂取させた後、高用量(300  $\mu$ g/マウス)のLPSを腹腔内投与し、エンドトキシンショックを引き起こさせた。その結果、寒天液1%の群は8/8と100%の死亡率であったが、10%寒天液の群は2/8と25%の死亡率であり、寒天が明らかにエンドトキシンショックを防いでいることが明らかとなった。同様に19日間寒天溶液を投与されたマウスに低用量のLPS(20  $\mu$ g/マウス)を腹腔内投与し、1時間後に血清内のTNF- $\alpha$ の量を調べてみると、10%寒天投与群で約30%低下していることが認められた。一方、マウス腹腔マクロファージをアガロビオースと共に6時間培養した後に、1  $\mu$ g/mlになるようにLPSを添加し24時間後にTNF- $\alpha$ の産生量を調べたところ、200  $\mu$ Mのアガロビオース存在下では、TNF- $\alpha$ の産生量が約60%低下していた(図3)<sup>7)</sup>。ヒト末梢血単核球



Data show mean  $\pm$  SE of 3 wells.

図4 アガロビオースがヒト末梢血単核球由来単球のTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響

由来単球で同様の実験を行うと、マウスの場合よりも、もっと低濃度でTNF- $\alpha$ の産生量を下げている(図4)。

#### 骨関節炎予防サプリメントへの利用

健康食品のなかでも、いろいろな病気に対応したいいわゆるサプリメントが売られている。骨関節炎に対するサプリメントとして、米国でコンドロイチン硫酸とグルコサミンが売られており、2000年の市場は1,200億ドルという調査報告がある。これらの化合物が骨関節炎に効くとして売られている唯一の根拠は、これらの2化合物がヒト関節の軟骨の構成成分であるというだけである。しかし、1980年代に、これらの化合物が骨関節炎の傷みを和らげるという報告があり、米国の国立健康衛生研究所(NIH)が約700万ドルを使って4年間の研究をスタートさせた。田辺製薬では抗TNF- $\alpha$ 抗体をリウマチの治療薬(商品名:レミケード)として開発している(フェーズII/III)。

寒天由来アガロオリゴ糖の経口摂取が、既に述べたようにリウマチの増悪原因の一つと考えられているTNF- $\alpha$ をはじめとする炎症惹起性のサイトカイン群の発現を抑制し、更にHO-1の発現を促進し、一酸化炭素をはじめとする抗酸化作用を持った種々の分子を作り出す。実際に南米のペルー辺りでは、寒天を固めたものがリウマチに効く民間薬として愛用されているようである。

これらのことを考慮すると、アガロオリゴ糖がある種のリウマチに対して効果を示す可能性は充分にあるものと推測されるので、マウスII型コラーゲン関節炎モデルを用いて寒天の治療効果を調べた。すなわち、マウスに、ウシ関節由来II型コラーゲン3mg/mlと等量のプロイント完全アジュバントを混合し、マウス尾根部皮下に150  $\mu$ g投与した。3週間後に再び同様にコラーゲンを追加免疫してII型コラーゲン関節炎を誘発させた。この後、分子量約6~7万の寒天(AX-30T, 伊那食品工業(株))0.3%水溶液と、アガロペンタオース、アガロオクタオース等が主成分であるアガロオリゴ糖3.0%溶液を飲水とトントを混合し、マウス尾根部皮下に150  $\mu$ g投与し

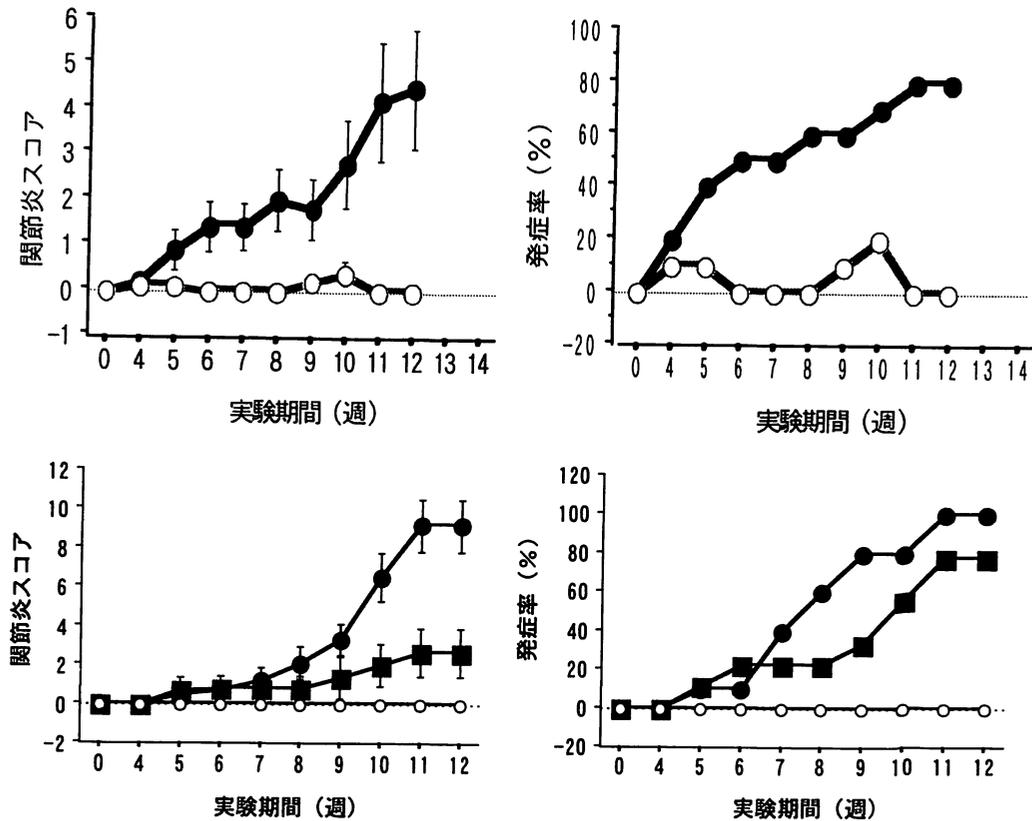


図5a (上) マウス関節炎モデルにおけるアガロースの治療効果

図5b (下) マウス関節炎モデルにおけるアガロオリゴ糖の治療効果

た。3週間後に再び同様にコラーゲンを追加免疫してII型コラーゲン関節炎を誘発させた。この後、分子量約6~7万の寒天 (AX-30T, 伊那食品工業 (株)) 0.3%水溶液と、アガロペンタオース、アガロオクタオース等が主成分であるアガロオリゴ糖3.0%溶液を飲水として自由に摂取させ、その治療効果を比較した。関節炎発症の評価は、0点：無変化、1点：一肢腫脹、2点：全体に見られる発赤腫脹、3点：全体に見られる強度の腫脹、4点：関節の強直性変化、で一肢あたりのスコアを採点し、4肢の合計点を1匹当たりの関節炎スコア(最高16点)とした (図5a, b)。

アガロオリゴ糖 (平均約6糖) を摂取した場合よりも、10分の1量の分子量約6~7万のアガロース分子 (平均約400糖) を摂取させた場合 (0.6 g/kg/day) の方が明らかに高い治療効果が認められた。この結果は一見矛盾しているように見えるが、アガロオリゴ糖は胃などでアガロビオースに分解されても、腸内で直ちにDGEに変換される。しかし、このDGEは非常に反応性に富んだ $\alpha\beta$ 位が不飽和のカルボニール基を持っているため、食物中のアミノ酸やタンパク質と瞬時に反応し、本来の機能を失ってしまうものと考えられる。例えば、DGEが本来持っていた一酸化窒素産生抑制作用は、アミノ酸誘導体のグルタチオンと反応するとかなり抑えられてしまう (図6)。一方、高分子型のアガロースはいったんアガロオリゴ糖になってからDGEになっていくので共存する食物中のアミノ酸やタンパク質との反応が抑えられた結果、有効なDGE濃度が高められたため、アガロオリゴ糖よりも高い治療効果が

得られたと考えることができる。

#### 寒天をベースにした健康食品の開発

上記のような、寒天やアガロオリゴ糖の極めて有用な生理作用を人々の健康に役立てるため、タカラバイオ(株)では、寒天をベースにした種々の健康食品を販売している。以下に、それらの商品を紹介する。

##### (1)「飲む寒天®」

アガロオリゴ糖が、一酸化窒素合成酵素の発現を抑制することを確認できたので、アガロオリゴ糖を「抗酸化オリゴ糖」と命名し、「体の酸化を抑え、さびをとる。」というコンセプトで、アガロオリゴ糖を含む健康飲料「飲む寒天®」を発売した。1本に200mlのアガロオリゴ糖を含む寒天溶液が入っている。寒天由来のアガロオリゴ糖の抗酸化力に加え、寒天を食べるものから飲むものへと変えた革新的な商品である (図7)。

##### (2)「アガレット®」

飲む寒天と同様に、「活性酸素(NO)を元から絶つ。」というコンセプトで、携帯に便利なアガロオリゴ糖入りの健康食品、「アガレット®」も発売した。錠剤で、ココア味とライム味があるがどちらも非常に好評である (図7)。

##### (3)「黒酢寒天®」

アガロオリゴ糖が、リウマチの増悪因子の一つとして考えられているTNF- $\alpha$ を初めとする炎症惹起性のサイトカイン群の発現を抑制すること及び関節炎モデル動物において関節

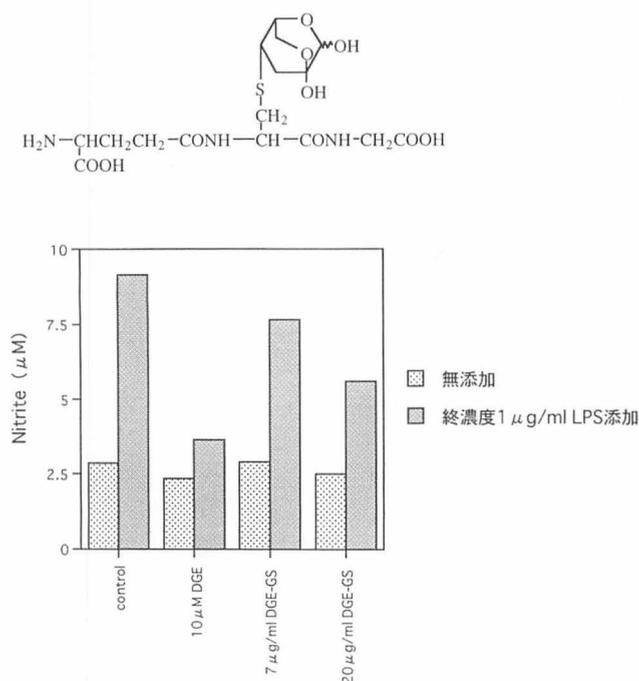


図6 DGEとグルタチオンとの複合体(上)およびそのNO産生抑制作用(下)

炎の治療効果があることも確認できたので、リウマチや関節炎の予防、治療を目的として健康飲料、「黒酢寒天<sup>®</sup>」発売した。相乗効果を期待して、関節に良いといわれている生姜を加え、体調を総合的に良くするといわれている黒酢で味を調えた飲料で、1本50ml入りである(図7)。愛飲者から、長年の関節痛が改善された、という話も聞くことができた

#### (4) 「ナチュラルアガー<sup>TM</sup>」

分子量が数万程度の寒天を、関節炎モデル動物に投与すると、関節炎の予防効果及び治療効果が確認できたことから、その寒天を1錠あたり200mg含有させた錠剤を商品化した(図7)。まもなく、発売するが、関節炎の治療効果に関しては大きな期待を寄せている。

#### (5) 「TaKaRa アガオリゴ<sup>®</sup>」

アガロオリゴ糖(2糖～8糖を主成分とする混合物)を食品素材、「TaKaRa アガオリゴ<sup>®</sup>」として発売した。白色粉末で、増量剤は含まない。寒天の様な溶解時の加熱は不要であり20%水溶液でも粘度は水とほとんど変わらない。アガロオリゴ糖はアルカリ条件下では不安定なので、酸性の食品への利用を勧めている。上記のような性質を持つ「TaKaRa アガオリゴ<sup>®</sup>」は、容易に種々の食品に利用することができるため、すでに「TaKaRa アガオリゴ<sup>®</sup>」を利用した商品がいくつかの企業から発売されているが、さらなる拡販を目指して宣伝中である。

以上の商品は、一部の薬局等で販売しているが、楽天市場(<http://www.rakuten.co.jp/takara/>)経由でも入手することが可能である。



図7 寒天及びアガロオリゴ糖を利用した健康食品

おわりに

筆者らのグループでは、アガロース分子内の $\alpha$ 1-3結合を切断する $\alpha$ -アガラゼを海洋性細菌からクローニングし、大腸菌での発現に成功している。将来的には、 $\alpha$ -アガラゼを利用して海藻から直接アガロオリゴ糖を調製するということが可能となるであろう。そうして得られたアガロオリゴ糖の中には、酸処理で得られたアガロオリゴ糖にはない、天然の構造を保持しているものがある可能性が高い。その結果は、紅藻多糖の天然の構造解明に繋がり、また、それらの新規アガロオリゴ糖の新しい生物活性の解明に繋がる可能性もある。今回の報告で述べたように、寒天及びアガロオリゴ糖は食物性繊維として捉えるだけでは想像もつかないような働きを持つ。また、アガロオリゴ糖の非還元末端は常にGalであり、肝臓細胞に非常に取り込まれ易いため、この性質を利用して、例えばドラッグデリバリーへの利用などの用途開発も可能である。

タカラバイオ(株)では、今後もアガロオリゴ糖及び寒天の機能性探索の努力を続けていくつもりである。

#### 参考文献

- 1) I. Kato, 月刊バイオインダストリー, 2000, 17, No.8, 13-19.
- 2) I. Kato, T. Enoki and H. Sagawa, 食品と開発, 2001, 36, No.9, 65-67.
- 3) T. Tominaga, E. Nishiyama, T. Enoki, H. Sagawa, S. Mizutani and I. Kato, 第58回日本癌学会総会記事, 1999, p151.
- 4) T. Enoki, H. Sagawa and I. Kato, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2000, p61.
- 5) E. M. Dioum, J. Rutter, J. R. Tuckerman, G. Gonzalez, Marie-Alda Gilles Gonzalez and S. L. Mcknight. Science, 2002, 298, 2385-2387.
- 6) L.E. Otterbein, F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. T. Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell and A. M. K. Choi, Nature Medicine, 2000, 6, 422-428.
- 7) T. Enoki, H. Sagawa and I. Kato 第59回日本癌学会総会記事, 2000, p215.

(タカラバイオ株式会社)