

北海道沿岸海藻類の抗ウイルス活性評価

津田正史^{1*}・岡本由美子¹・寫田智²

¹北海道大学大学院薬学研究院 〒060-0812 北海道札幌市北区北12条西6丁目

²北海道大学創成科学共同研究機構 〒060-0810 北海道札幌市北区北10条西8丁目

Test for antiviral activity against Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma related herpes virus by seaweeds distributed in Hokkaido, Japan.

Masashi Tsuda¹, Yumiko Okamoto¹ & Satoshi Shimada²

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo 060-0812, Japan

* E-mail: mtsuda@pharm.hokudai.ac.jp

²Creative Research Initiative "Sousei", Hokkaido University, Sapporo, 060-0810 Japan

E-mail: sshimada@sci.hokudai.ac.jp

Abstract: A total of 29 samples of 26 species of marine algae were collected at Hokkaido, Japan, and tested for antiviral activity against Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma related herpes virus. Water-soluble materials of brown algae *Sargassum thunbergii* (Mertens ex Roth) Kunz, *Dictyosiphon divaricata* (Okamura) Okamura, *Petalonia zosterifolia* (Reinke) Kunz, red algae *Hyalosiphonia caespitosa* Okamura, *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi and *Gloiopeltis furcata* (Postels et Ruprecht) J. Agardh showed moderate antiviral activities.

Key words: Epstein-Barr virus, Kaposi sarcoma, herpes virus, Hokkaido, Seaweeds

緒 言

日本には、緑藻237種、褐藻307種、紅藻869種の計1413種の海藻類が生育している(吉田ら, 2005)。各地域により生育する海藻類は異なり、例えば琉球列島にはカサノリ類を代表する緑藻類が多く、緑藻109種、褐藻72種、紅藻194種

の計375種(瀬川・香村, 1960)が生育し、一方、北海道にはコンブ類などの褐藻類が多く、緑藻42種、褐藻98種、紅藻172種の計312種が生育している(川井・黒木, 1982; Sakai, 1986; Yamada & Tanaka, 1944)。

海藻類は食用としての利用が多いが、最近では、機能性食品、化粧品、医化学用基剤、肥料、飼料など多岐にわたって利用されている。また、医薬品としての利用につながるような海藻類のMRSAに対する抗菌性や(亀井ら, 1995)、抗腫瘍活性も報告されている(原田ら, 1996)。

ヒトヘルペスウイルスの一種であるEpstein-Barrウイルス(EBV)は、バーキットリンパ腫や免疫抑制患者の日和見リンパ球増殖症、ホジキンリンパ腫などのB細胞性腫瘍だけでなく上咽頭癌、胃癌などの上皮性腫瘍やさまざまな組織腫瘍に関連していることがわかっている。また、小児に多くみられる慢性活動性EBV感染症や種痘様水疱症の原因ウイルスでもある。エイズの日和見感染症であるカポジ肉腫は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)感染により発症する。これらウイルスは、既存の抗ウイルス薬は無効であり、通常の抗がん化学療法や放射線療法に対しても抵抗性や易再発性のもの

が多い。

本研究では、北海道沿岸から30サンプル27種の海藻類を採集し、これらヘルペスウイルスに対する抗ウイルス活性について調査した。

材料と方法

海藻抽出液

北海道沿岸から計29サンプル、26種(褐藻類10種、紅藻類14種、緑藻類2種)を採集し、採集した海藻サンプルは、風乾し乾燥重量10gに対してEtOHを150mL加えホモジナイズして低温室で3日間浸し遠心分離(3,500rpm, 10min, 4℃)し得られた上澄みの溶媒をエバポレーターで除去しEtOH抽出画分とした。EtOH抽出後の残渣にH₂Oを150mL加えウォーターバスで80℃, 4h加温し、ガーゼでろ過して得られた上澄みを凍結乾燥しH₂O抽出画分とした。H₂O抽出後の残渣に0.1M-HClを100mL加えウォーターバスで80℃, 4h加温し、ガーゼでろ過して得られた上澄みを凍結乾燥しHCl抽出画分とした(抽出液の中和にはNa₂CO₃を用いた)。H₂O抽出画分とHCl抽出画分を抗ウイルス活性に供した。

抗ウイルス活性

抗ウイルス活性は、腫瘍細胞にH₂O抽出画分とHCl抽出画分を添加し一定時間培養後、生細胞数を計測しその増殖率から評価した。供試細胞は、Burkitt'sリンパ腫のDG75細胞(EBV, KSHV陰性)とB細胞リンパ腫のBC2細胞(EBV, KSHV陽性)を用いた(それぞれヒト由来, ATCCより購入)。培地は、RPMI1640(SIGMA, St. Louis, MO)に牛胎児血清(FBS, Hyclone, Logan, UT)と仔牛血清(CS, Moregate, New Zealand)をそれぞれ10%添加した。評価方法は、培養細胞を10×10⁴細胞/mLとなるように調製し、96wellマイクロプレートに50μL添加した後、新鮮な培地を49μL加え全量を99μLとし、試料(最終濃度の100倍濃度となるように滅菌水で調整)を1μL添加し、CO₂インキュベーター内で37℃, CO₂濃度5%, 72時間培養後に生細胞数を計測した。各資料について、評価濃度は30μg/mLと100μg/mL, 3wellずつ行った。ブランクは、試料を添加せず培養したものをを用いた。controlとしてまた、5-FUとドクソルビシン(いずれもWako Pure Chemical, Osaka)についても同様に行った。生細胞数の計測は、Wako cell counting Kit-8(Wako Pure Chemical, Osaka)

を10μL/wellずつ添加し、CO₂インキュベーター内で3時間呈色反応を行い、マイクロプレートリーダーで450nm(参照波長620nm)の吸光度を測定し、次式より算出した。

阻害率(%)=(1-(サンプル/ブランク))×100
この値をグラフにプロットしてIC₅₀値を算出した。

結 果

海藻抽出液添加の活性評価

北海道沿岸から採集した海藻類のH₂O抽出画分とHCl抽出画分についてDG75細胞とBC2細胞に対する殺細胞活性の評価を行った(Table1)。その結果、まずH₂O抽出画分の腫瘍細胞DG75に対する殺細胞活性は、ほとんど見られなかった。最も高い褐藻スジメでも100μg/mL添加時において37.2%の活性に留まった。

H₂O抽出画分のBC2細胞に対する40%を超える殺細胞活性は、褐藻エゾハヤズ、褐藻ホソバノセイヨウハバノリ、褐藻ウミトラノオ、紅藻イソウメモドキ、紅藻フダラク、紅藻フクロフノリおよび紅藻フシツナギで見られた。特に褐藻ホソバノセイヨウハバノリは30μg/mL添加時において60%を超える活性を示し、100μg/mL添加時には紅藻フダラクが70.9%と最も高かった。

HCl抽出画分の腫瘍細胞DG75に対する40%を超える殺細胞活性は、褐藻スジメ、褐藻ウミトラノオ、紅藻フクロフノリおよび紅藻ユナで見られた。特に褐藻スジメは30μg/mL添加時において58.2%と最も高い活性を示した。

HCl抽出画分は腫瘍細胞BC2に対する40%を超える殺細胞活性は、褐藻エゾハヤズ、褐藻ホソバノセイヨウハバノリ、褐藻スジメ、褐藻ウミトラノオ、紅藻ナンブグサ、紅藻フダラク、紅藻フクロフノリ、紅藻フシツナギおよび紅藻ユナで見られた。特に紅藻フダラクは30μg/mL添加時において90%を超える強い活性を示した。

考 察

本研究で用いたスクリーニングは、ヘルペスウイルス感染性がん細胞と非感染性がん細胞に対する殺細胞活性を比較することで、簡便にヘルペスウイルスによる細胞の不死化を阻害する

Table 1. Antiviral activity of Water-soluble & HCl-soluble materials (%)

Class	Japanese name	Scientific name	H ₂ O-ext				HCl-ext			
			DG75		BC2		DG75		BC2	
			30 µg/mL	100 µg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL
Chlorophyceae	Ooba-aosa	<i>Ulva lactuca</i>	-	-	8.6	18.7	5.1	-	2.1	18.6
	Miru	<i>Codium fragile</i>	0.1	-	1.9	-	-	6.2	4.2	8.5
Phaeophyceae	Ezo-yahazu	<i>Dictyopteris divaricata</i>	-	-	30.1	40.5*	16.3	32.6	41.1*	56.5*
	Kayamonori	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	-	8.1	7.8	11.7	13.0	2.4	9.9	13.1
	Hosobano-seiyohabanori	<i>Petalonia zosterifolia</i>	31.7	25.5	66.4*	68.6*	25.1	-	70.5*	73.8*
	Matsumo	<i>Analips japonicus</i>	-	-	18.5	-	-	24.1	-	25.4
	Keurushigusa	<i>Desmarestia viridis</i>	0.1	-	0.8	-	1.0	-	11.4	-
	Ainu-wakame	<i>Alaria praelonga</i>	1.1	5.0	14.2	3.5	12.2	8.7	9.7	18.7
	Sujime	<i>Costaria costata</i>	19.4	37.2	6.7	-	58.2*	18.6	83.0*	35.5
	Akamoku	<i>Sargassum horneri</i>	3.0	8.8	19.1	25.1	26.9	36.2	38.3	36.4
	Umitoranoo	<i>Sargassum thunbergii</i>	-	28.3	43.0*	58.4*	13.0	46.5*	31.7	62.1*
	Miyabemoku	<i>Sargassum miyabei</i>	-	5.5	15.1	21.6	-	9.5	-	13.1
Rhodophyceae	Uppuruinori	<i>Porphyra pseudolinearis</i>	0.1	-	7.1	10.3	11.8	3.2	21.5	3.2
	Naubugusa	<i>Gelidium subfastigiatum</i>	0.9	2.5	2.4	17.7	1.6	-	37.5	52.8*
	Akaba-ginnansou	<i>Mazzaella japonica</i>	4.3	19.6	-	7.6	-	2.1	4.4	3.3
	Isoumemodoki	<i>Hyalosiphonia caespitosa</i>	3.5	11.5	29.2	44.6*	29.9	25.4	28.6	28.2
	Kabanori	<i>Gracilaria textorii</i>	-	-	5.1	3.5	-	-	-	-
	Katanori	<i>Gratelupia divaricata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hiramukade	<i>Grateloupia livida</i>	-	-	0.0	26.2	5.1	0.3	4.7	8.5
	Hudaraku	<i>Grateloupia lanceolata</i>	2.3	21.6	37.6	70.9*	10.0	34.4	91.7*	-
		<i>Grateloupia</i> sp.	-	-	-	26.3	-	-	-	-
	Kuroha-ginnansou	<i>Chodrus yendoi</i>	-	-	-	-	-	6.5	-	23.9
	Darusu	<i>Palmaria palmata</i>	-	1.5	18.2	11.9	-	-	1.5	5.0
	Hukuro-hunori	<i>Gloiopeltis furcata</i>	-	10.8	-	54.7*	37.4	45.5*	70.2*	70.2*
	Hushitunagi	<i>Lomentaria catenata</i>	11.4	16.3	48.5*	21.0	23.1	25.6	48.8*	75.8*
	Yuna	<i>Chondria crassicaulis</i>	16.2	-	18.3	5.0	30.0	43.5*	38.5	42.2*

*: more than 40% antiviral activity

-: no antiviral activity

作用の評価が可能である。

DG75細胞とBC2細胞を用いて北海道に生育する海藻類から抽出したH₂O抽出画分とHCl抽出画分の殺細胞活性を評価した。その結果、H₂O抽出画分はBC2細胞のみ、HCl抽出画分では両細胞に対して殺細胞活性が示され、特にBC2細胞に対して高い殺細胞活性が示された。この結果から、試験を行った北海道産海藻のH₂O抽出画分とHCl抽出画分は、ヘルペスウイルス感染性細胞に対して選択的に作用する成分の存在が示唆される。

本研究で活性評価に供した緑藻類の2種では、どちらの抽出液も両腫瘍細胞に対する殺細胞活性は認められなかった。褐藻類では10種類中、エゾヤハズ、ホソバノセイヨウハバノリ、スジメおよびウミトラノオの4種にウイルス感染性細胞に対する殺細胞活性が見られた。紅藻類では14種類中、ナンブグサ、イソウメモドキ、フダラク、フクロフノリ、フシツナギおよびユナの6種にウイルス感染性細胞に対する殺細胞活性が認められた。今後の活性評価により、さらにヘルペスウイルス感染性細胞に対する強い殺

細胞活性を持つ海藻種が発見できる可能性が高い。

抗ウイルス活性と生物系統的な関係は無く、例えば、ムカデノリ属のカタノリにはまったくこれらの殺細胞活性が認められないが、フダラクでは殺細胞活性が最も強い値を示した。本研究では2種の緑藻類は、いずれの細胞に対しても殺細胞活性を示さなかったが、調査した種類数が少ないため、これが緑藻類の全てで共通しているのかは判断できない。

これら海藻類の水溶性抽出物は、ドキシソルピシと比較すると殺細胞活性を示すのに高濃度を必要とするが、ヘルペスウイルス感染性BC2細胞に対してのみ細胞の増殖を強く抑制し、その活性には濃度依存性が認められた。この結果より、これらの海藻抽出物は、ヘルペスウイルスの感染によって誘引される腫瘍に対して特異的に作用する物質が含まれていると考えられる。これら活性物質の分離精製ならびに化学構造の解明がなされれば、新しいヘルペスウイルス由来癌腫の治療薬の開発につながるものと期待される。

引用文献

- 原田秀樹・野呂忠秀・亀井勇統. 1996. 九州沿岸海藻の *in vitro* における抗腫瘍活性のスクリーニング. 海と台地, 3: 53-64.
- 亀井勇統・野呂忠秀・竹山健一. 1995. 九州沿岸海藻の抗菌活性の検索. 海と台地, 1: 11-19.
- 川井浩史・黒木宗尚. 1982. 北海道オホーツク海沿岸の海藻相. 北大院環境科学研究科紀要, 5: 79-90.
- Sakai, Y. 1986. A list of marine algae from the vicinity of the institute of algological research of Hokkaido University, Muroran, Japan. *Sci. Pap. Inst. Algal. Res., Fac. Sci., Hokkaido Univ.*, 8: 1-30.
- 瀬川宗吉・香村真徳. 1960. 琉球列島海藻目録. 琉大普及叢書, 17: 1-72.
- Yamada, Y. & Tanaka, T. 1944. Marine algae in the vicinity of the Akkeshi Marine Biological Station. *Sci. Pap. Inst. Algal. Res., Fac. Sci., Hokkaido Univ.*, 3: 47-77.
- 吉田忠生・畠田智・吉永一男・中島泰. 2005. 日本海藻目録 (改訂版). 藻類, 53: 179-228.