

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

スサビノリ *Pyropia*

*yezoensis*由来硫酸化多糖ポルフィランの体内吸収に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 川井, 大地 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1917">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1917</a>

修士学位論文

スサビノリ *Pyropia yezoensis* 由来硫酸化多糖ポルフィランの  
体内吸収に関する研究

2019 年度  
(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院  
海洋科学技術研究科  
食機能保全科学専攻

川井 大地

## 目次

第1章	序論	1
1.1	海苔生産の歴史と現状	1
1.2	海苔の有用成分とその変動	3
1.3	海苔の多糖成分とポルフィラン	5
1.4	ポルフィランおよび硫酸化多糖の生理作用	6
1.5	ポルフィランの消化・微生物による発酵能と多糖の体内吸収について	8
1.6	目的	8
第2章	試料および方法	9
2.1	試料	9
2.2	器具・試薬	9
2.3	実験動物	10
2.4	無水メルカプトリシス法による多糖構成糖の分析	10
2.4.1	無水メルカプトリシス反応	10
2.4.2	逆相高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析法による遊離単糖誘導体の分析	11
2.5	マウスに対するサンプル経口投与後の血中多糖構成糖の測定	13
2.5.1	ガラクトース経口投与後の血中濃度の測定	14
2.5.2	ポルフィラン経口投与後の血中濃度の測定	14
2.5.3	血液中のポルフィラン抽出方法の検討	14
2.5.4	血液中単糖の除去方法の検討	15
2.5.5	ポルフィランのマウス血液中への移行の確認	15
2.5.6	ポルフィラン経口投与後の血中濃度の経時変化	16
2.6	ポルフィラン飲水投与によるマウス腸管内への影響	16
2.7	統計解析	17
第3章	結果および考察	17
3.1	無水メルカプトリシス法による多糖構成糖の検出とガラクトース検量線の作成	17
3.2	マウスに対するサンプル経口投与後の血中構成糖の分析	18
3.2.1	ガラクトース経口投与後の血中濃度の測定	18
3.2.2	ポルフィラン経口投与後の血中濃度の測定	19
3.2.3	血液中のポルフィラン抽出方法の検討	21
3.2.4	血液中単糖の除去方法の検討	22
3.2.5	ポルフィランのマウス血液中への移行の確認	22
3.2.6	マウスに対するポルフィラン経口投与後の血中濃度の経時変化	23
3.3	ポルフィランの飲水投与によるマウス腸管内への影響	27
第4章	結論	36
	謝辞	36
	参考文献	37

## 第1章 序論

### 1.1 海苔生産の歴史と現状

海苔\*は日本人にとって最も身近な食品である。その歴史は長く、飛鳥・奈良時代（西暦 600～784 年頃）にはすでに文書に記録がある（能登谷，2002）。当時，天然の海苔はニギメ（ワカメ）やアラメなどの海藻に比べ高級品であり，貢納品として位の高い者にしか支給されていなかった。海苔の養殖が始まり供給され始めたのは江戸時代（1700 年代）の品川の海岸だと言われており，浅海域を利用した養殖法と薄くシート状に加工する製法は，商人の手により諸国へ広まり各地で生産が行われるようになった。明治時代になり物流の自由化や輸送機関の進歩により海苔の存在は全国に普及し，国民的な食品となった。平成に入ると養殖法の改良や生産地の増加により，年生産 30 万トンを超えるまで発展してきた。しかし，近年海苔の収穫量は 1994 年以降減少傾向にあり，2018 年には 28 万 4200 トンと，1975 年と同程度まで落ち込んでいる（Fig. 1-1）。原因の一つとして海苔の低価格化がある。安い輸入品の流入や高値がつく贈答品としての利用が減ったからである。最近になりコンビニやスーパーマーケットのおにぎりに国産の海苔が使用されるようになり，価格はある程度回復し安定しているが，海苔生産事業者の 9 割近くを占める個人経営体の漁労収入は横ばいである。現代においても海苔は日本の食卓に欠かせない食材であるにも関わらず，経営体数の減少も顕著であり 2000 年代には海苔養殖の経営体数は 1/4 程度まで減少している（Fig. 1-2）。高い収入が得られないこと，働き手の高齢化や後継者不足などが現在の状況を引き起こしたと考えられる。これらの問題を解決するため，海苔の高い栄養価や機能性に注目し，高付加価値化を目指した研究が現在行われている。

---

\*) ここでの「のり」の表記方法として，漢字の「海苔」は焼海苔，乾海苔など食品としての「のり」を，カタカナの「ノリ」は生物学的なのりを指す場合にそれぞれ使用することとした。

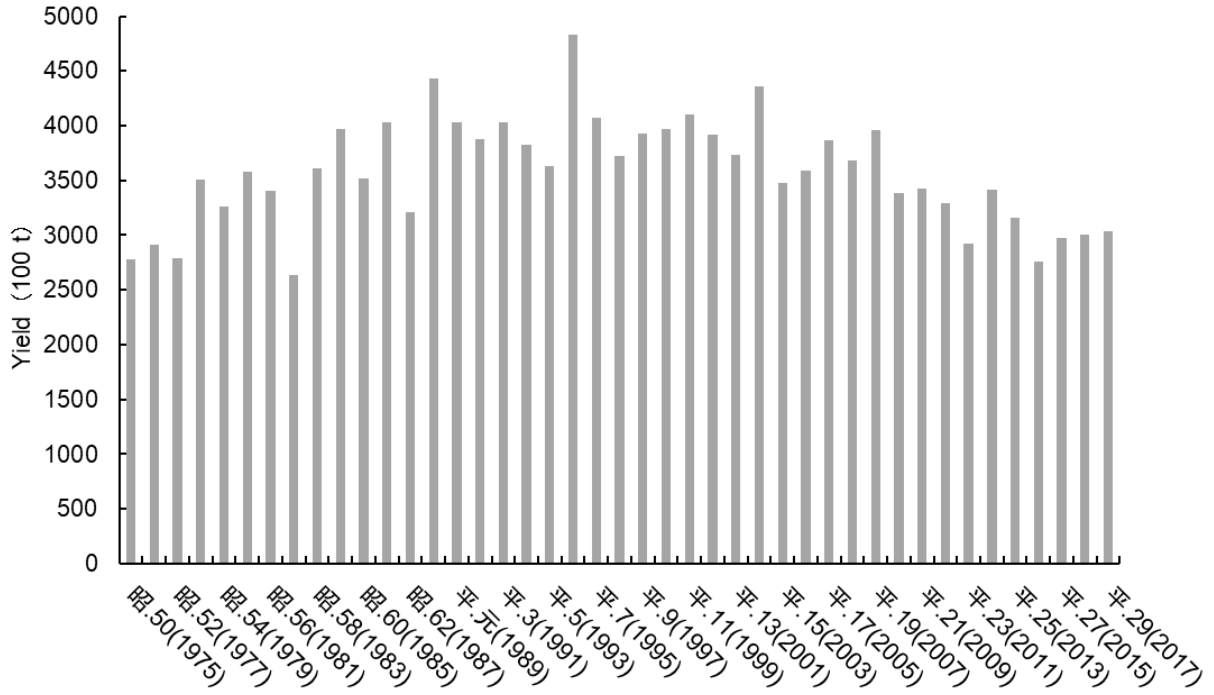


Fig. 1-1 のり類収穫量の推移  
農林水産省漁業経営調査長期累計より

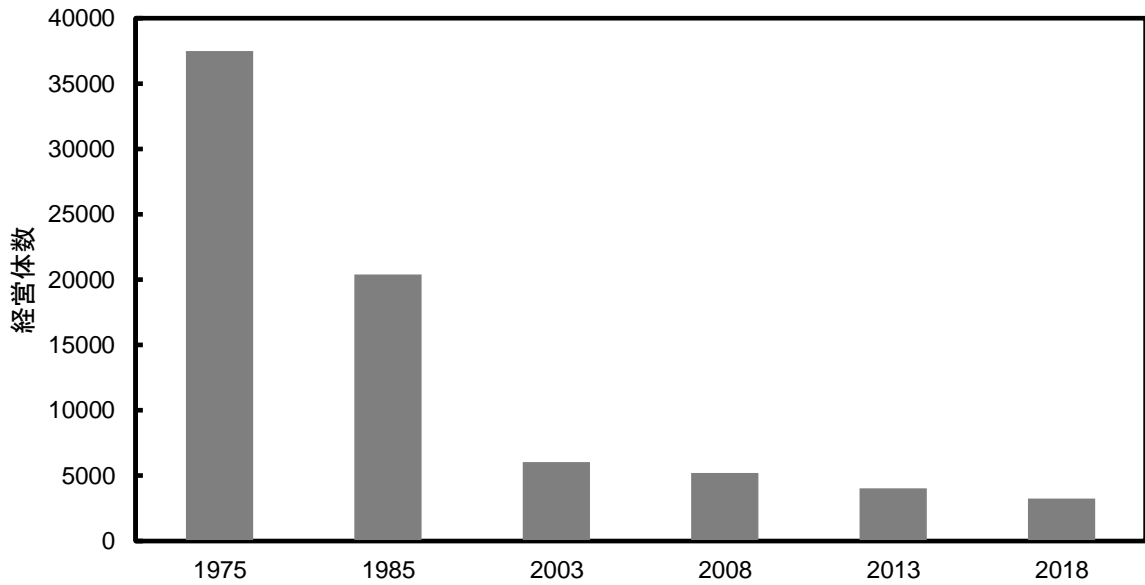


Fig. 1-2 のり類養殖経営体数の推移  
農林水産省 漁業経営調査報告書 漁業センサス（2003、2008、2013、2018）より

## 1. 2 海苔の有用成分とその変動

食資源として重要な天然に存在するノリを利用するため、その生物学的、化学的研究が進められてきた。例えば養殖技術としては、ノリの種（たね）である糸状体を使用し人工的に採苗する技術が確立されている。採苗とは、「たね網」と呼ばれるノリの寝床となる網にカキの貝殻で培養した糸状体が出す胞子を付着させることである。採苗の為に5~6ヶ月以前からノリ糸状体を貝殻で培養をしておく必要があるため、採苗が行われる9月中旬よりもずっと前、3~4月には海苔生産は始まる。採苗を終えると、たね網は一時的に冷凍庫に保存され、適した時期に漁場へ張り込まれる。この一時的な冷凍保存はノリの育成に合わない天候や漁場環境を避けることができ、海苔の品質や大量生産を可能とした。冷凍保存されたたね網はシーズン中4, 5回ほど収穫済みの網と交換する。冷凍せずにそのまま漁場へ張り込んだものを秋芽網、冷凍したものを冷凍網と呼ぶ。摘み取られたノリは洗浄後、機械により細断され抄いて四角い形となる。これを乾燥したものを「乾海苔（ほしのり）」と呼び、通常これが海苔問屋の入札会にかけられる。「焼海苔（やきのり）」は問屋により火入れ作業がなされたものであり、消費者が普段口にするものである。海苔の成分の中には季節や年度、生産地により含量や組成が異なるものがあることが報告されている（荒木ら1977, 濱ら2011）。

海苔には、その味や香りなどを呈する成分をはじめとして栄養学的にも重要な成分が多く含まれている。特に他の食用海藻類に比べてタンパク質含量が多いことが知られている。日本食品標準成分表（Table 1-1）によれば、海苔100gあたりおよそ40gのタンパク質が含まれており、これは他の海藻に比べておよそ2~8倍の量である。豊富に含まれるタンパク質から得られた海苔ペプチドには血圧上昇抑制作用が見出されており（Saito *et al.*, 2000, Nakamichi *et al.*, 2002）、機能性食品として利用されている。

Table 1-1. Food composition (g/100 g-food)\*

	Water	Protein	Lipid	Carbohydrate	Ash
Dried Nori	8.4	39.4	3.7	38.7	9.8
Rosted Nori	2.3	41.4	3.7	44.3	8.3
Dried Aosa	16.9	22.1	0.6	41.7	18.7
Dried Naga-kombu	10.0	8.3	1.5	58.5	21.7
Dried Ma-kombu	9.5	5.8	1.3	64.3	19.1
Dried Mitsuishi-kombu	9.2	7.7	1.9	64.7	16.5
Dried Tengusa	15.2	16.1	1.0	53.8	13.9
Dried Hunori	14.7	13.8	1.0	57.8	12.7
Wakame	89.0	1.9	0.2	5.6	3.3
Dried wakame	12.7	13.6	1.6	41.3	30.8
Dried Hijiki	6.5	9.2	3.2	58.4	22.7

\*: 日本食品標準成分表 2015 年七訂

この他にも海藻などの水産物に含まれるマイコスポリン様アミノ酸の一種で抗酸化作用を持つポルフィラ-334 (Tao *et al.*, 2008) や、プレバイオティック効果を持つグリセロールガラクトシド (Ishihara *et al.*, 2010) などが海苔の有用成分として知られている。

Table 1-2. Functional compound in nori

Compound	Functionality	Reference
Porphyra-334	Antioxidant activity	Tao <i>et al.</i> , 2008
		De la Coba <i>et al.</i> , 2009
	Immunomodulatory effect	Becker <i>et al.</i> , 2016
Glycerol galactoside	Probiotic effect	Ishihara <i>et al.</i> , 2010
Nori-peptide	Antihypertensive activity	Umekawa <i>et al.</i> , 2008
		Nakamichi <i>et al.</i> , 2002
Anserine	Antioxidant activity	Tamura <i>et al.</i> , 1998

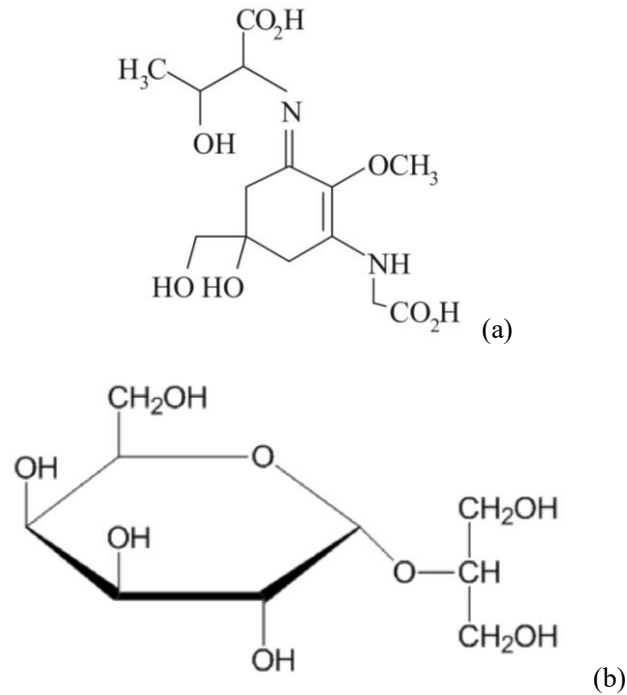


Fig. 1-3 Structure of pophyra-334 (a) and glycerol galactoside (b)

### 1. 3 海苔の多糖成分とポルフィラン

海苔に含まれている多糖成分としては、マンナン、キシラン、紅藻デンプンそしてポルフィランが知られている。これらの多糖は細胞壁や細胞間充填物質の構成成分、細胞質内の貯蔵多糖として存在している。ノリの糖質は乾燥重量の約45%を占めているが、このほとんどがこれらの多糖である。

Table 1-3. Polysaccharides composition in nori (Hama *et al.*, 2011)

polysaccharide	Contents (%)
Porphyran	82 - 89
Mannan	10 - 14
Xylan	1.7 - 2.4
Starch	0.8 - 1.7

ポルフィランはノリに最も多く含まれる糖質である。ノリの細胞壁間に存在する水溶性の粘質多糖で乾燥重量の約30%含まれている。ポルフィランは1957年に紅藻の *Porphyra capensis* から単離され (Nunn and von Holdt, 1957), その後の研究の結果, 6-O-硫酸- $\alpha$ -L-ガラクトピラノース, D-ガラクトピラノース, 3,6-アンヒドロ- $\alpha$ -L-ガラクトピラノース (AG), D-ガラクトピラノースからなる硫酸化



多糖であることが確認された (Su and Hassjd, 1962, Peat *et al.*, 1961, Anderson and Rees, 1965, Morrice *et al.*, 1983).

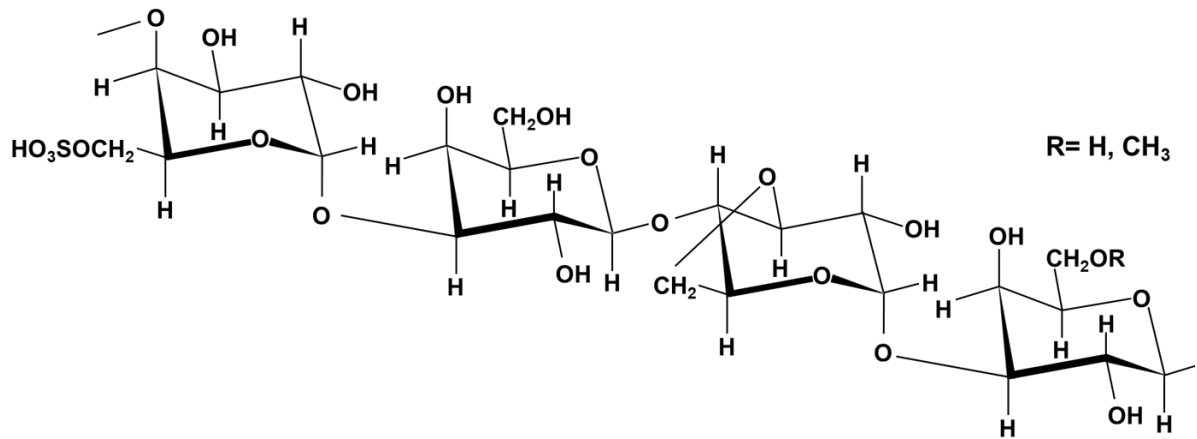


Fig. 1-4 Primary structure of Porphyran (Lora M. Morrice *et al.*, 1983)

6-O-sulphate- $\alpha$ -L-galactose-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactose-(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactose and 6-O-methylated derivative

ポルフィランの組成は海苔養殖における摘採時期や成育環境により変動する事が知られている (荒木ら 1977, 濱ら 2011). 荒木らは乾海苔の産地間および摘採時期によるアンヒドロガラクトースの含量の違いを調査し、全構成糖のおよそ 5%から 11%程度は変化することを報告している. 濱らも同様の調査を行っており、こちらはおよそ 21%から 26%は変化があると報告している. このような構成糖の変化は海苔のテクスチャーが変化するので、品質の指標に活用できるとされている.

#### 1. 4 ポルフィランおよび硫酸化多糖の生理作用

ポルフィランにはこれまでに様々な生理作用が見出されてきた. *in vivo*の実験系においては, Kitano *et al.*, 2012 では 2 型糖尿病モデルマウスに対しポルフィラン添加餌で給餌試験を行った結果, 血漿中のインスリン量の低下およびアディポネクチン量の増加を確認し, ポルフィランがグルコース代謝に影響する事を示した. Tuge *et al.*, 1998 はラットに対しポルフィラン添加餌で給餌試験を行った結果, 摂餌量と体重増加を抑制し, 腎周囲脂肪組織重量および血清コレステロール量の減少を確認し, ポルフィランがラットの成長および脂質代謝に及ぼす影響を示した. Cao *et al.*, 2016 によるとポルフィランには肝障害を緩和する作用も報告もされている. マウスに対する高脂肪食給餌試験において, 肝臓

ダメージの指標である血清中の ALT, AST および ALP の値がポルフィラン投与群において改善される傾向が見られた. *in vitro* の実験系においては, ポルフィランの脂質代謝に対する効果は示されている. Inoue *et al.*, 2009 によるとヒト癌細胞 HepG2 細胞に脂肪酸を添加し, ポルフィランを添加した群と添加しない群で脂質合成の様子を観察した結果, 遊離コレステロールとコレステロールエステル, トリグリセリドの合成が抑制された事, 脂質合成の抑制因子である apoB100 が減少する事を報告している. このほかにも免疫賦活作用 (北島ら, 2013) や抗腫瘍作用 (Noda *et al.*, 1989) が報告されている.

上記の *in vivo* 実験における報告では, これらの作用機序は食物繊維と同様な食品成分の腸管内における吸収阻害によるものであると説明されている. しかし, 硫酸化率のことなるポルフィラン, もしくはポルフィラン由来オリゴ糖をマウスに与えた場合に血清コレステロールの低下作用に違いが見られた報告 (大住ら, 1998, Tsuge *et al.*, 2004) があり, 硫酸化率の違いが影響すること, また, 高分子構造でなくとも同作用が発揮される事が示されており, 食物繊維様の作用機序では説明のつかない生理作用も関与している可能性が示唆される. このようにいまだポルフィランの作用機序については不明な点が残されている.

ポルフィラン以外にも海藻などに含まれる天然の硫酸化多糖には様々な生理作用が見出されている. 例えば, 褐藻に含まれるフコイダンには免疫賦活作用や血液凝固作用などが, 動物の結合組織に存在するコンドロイチン硫酸には関節痛や神経痛に対する作用がそれぞれ知られており, 医薬品や健康食品としての利用もされている. 一方で, ポルフィランと同じく硫酸化ガラクトサンであるカラギーナンには経口投与により実験動物に対して潰瘍性大腸炎を引き起こすことが報告されている (J. Watt and R. Marcus, 1971). 潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) とは炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) の一つで, 大腸の粘膜にびらんや潰瘍を形成する非特異性炎症性疾患である. 臨床症状として下痢, 血便および体重減少などの特徴的な症状がみられる. この潰瘍性大腸炎を実験的に誘導するため汎用されているデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) も硫酸化多糖である. DSS, カラギーナンともに, 潰瘍性大腸炎を引き起こす機序についてはいまだ不明な点が多いが, 大腸上皮細胞がこれらの硫酸化多糖を吸収すること, 大腸上皮細胞のアポトーシスを誘導することが報告されていることから (Araki *et al.*, 2012, Ling *et al.*, 1988) 腸管上皮細胞への吸収が炎症を引き起こす一因である

可能性が示唆されている。

### 1. 5 ポルフィランの消化・微生物による発酵能と多糖の体内吸収について

前述したようにポルフィランはガラクトースとその修飾体からなる硫酸化多糖である。そのため、他の多糖同様に腸管内における食物繊維様作用や微生物による発酵能について研究されてきた。河津ら（1995）はヒトの代表的な腸内細菌による発酵能とラットへの給餌試験により腸内フローラに及ぼす影響を報告している。報告によればポルフィランは *in vitro* で *Bacteroides* 属（ヒト口腔内から腸内までの細菌叢を構成する優勢菌の一つ）の数株によって発酵が認められ、有用菌とされる *Bifidobacterium* 属では発酵されず、*in vivo* では総菌数の減少傾向以外は細菌叢に大きな変化は認められなかった。また、ラット盲腸内の pH の低下、アンモニア量の低下、および盲腸内内容物重量と糞便重量の増加を確認し、水溶性食物繊維と同様な腸内環境改善効果がある事を示している。一方、大住ら（1998）はポルフィラン由来のオリゴ糖の各生体内消化酵素に対する消化性を調べており、ほとんど消化されない事を確認している。

一般に、食物繊維様の多糖は分解されないために体内へ吸収されないと考えられている。しかし、いくつかの多糖では体内吸収の報告がある。大塚らはラットにおいて蛍光ラベル化したペプチドマンナンを経口投与し、胸管リンパ液および血液中への移行を確認しており、リンパ液においては分子サイズを保持したまま取り込まれている可能性を示唆している。Sakurai *et al.*, 1996 ではマウスにおいてペクチンを経口投与後に肝臓への蓄積を報告している。海苔の機能性の研究においてもポルフィランが吸収されるかどうかは重要な位置づけで、明らかにされなくてはならない。

### 1. 6 目的

ポルフィランには様々な健康機能性が見出されているが、その体内吸収および作用機序に不明な点が多くある。一部の多糖では分解されずに、もしくは一부분解したものが体内へ吸収されることが報告されており（大塚ら, 1981, Sakurai *et al.*, 1996）、新たな機能性や作用機構の解明の可能性が示唆されている。ポルフィランの体内吸収に関する研究例は報告されていない。そこで本研究ではマウスに対しサビノリ *Pyropia yezoensis* 由来の硫酸化多糖であるポルフィランを投与し、無水メルカプトリシス法により体内への移行の可能性を化学的分析結果を指標に評価した。また、ポルフィランのマ

ウス腸管内への作用を確認した。

## 第2章 試料および方法

### 2.1 試料

試験用の海苔サンプルは、兵庫県神戸市漁協沖漁場で試験生産されたスサビノリを原料に加工した焼海苔として一般財団法人海苔増殖振興会から供給していただいた。本研究では焼海苔から抽出物を調製して実験を行った。焼海苔 50 g をブレンダーで粉末にし、1 L の 80%メタノールを加えて 60°C で 3 時間加熱した。この操作を再度繰り返し行い得られた残渣に、80 倍量の熱水を加えて 90°C で 2 時間加熱した。この操作を再度繰り返して得られた抽出液をろ過、減圧濃縮、凍結乾燥したものをノリ熱水抽出物とした。得られたノリ熱水抽出物に酢酸で pH 5.0 に調製した 0.5 M 酢酸ナトリウム水溶液を約 150 倍量加え、そこに濃度が 38%になるようにエタノールを加えた。室温で 1 時間放置後、ろ過して得られたろ液に濃度が 60%になるようエタノールを加え、4000 rpm で 3 分間遠心分離した。上清を除いた沈殿物を蒸留水に溶かし、蒸留水に対して透析を行い、減圧濃縮、凍結乾燥させたものを粗ポルフィランとした。

潰瘍性大腸炎との関連を調査する実験には、ノリ熱水抽出物に濃度が約 70%となるようエタノールを加えて、沈殿した画分を凍結乾燥させて得られたエタノール沈殿画分 (NEP) を用いた。

### 2.2 器具・試薬

メタノール (MeOH), エタノール (EtOH), アセトニトリル (ACN, HPLC), エチレンジアミン四酢酸三カリウム二水和物 (EDTA · 2K · 2H<sub>2</sub>O, 鹿一級), D(+)-グルコース (Glu) は関東化学株式会社 (東京, 日本) から購入した。酢酸ナトリウム三水和物, L-アラビノース (Ala), ガラクトース (Gal), D(+)-マンノース (Man) は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。D(+)-キシロース (Xyl), エタンチオール (EtSH), 5~10%塩酸-メタノールは東京化成株式会社から購入した。Agarose, Type I は Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) から購入した。デキストラン硫酸ナトリウム 5000 (DSS, 平均分子量 5000, 分子量範囲 1000 - 9000) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪, 日本) から購入した。Develosil<sup>®</sup> RP-AQUEOUS-AR-5 (4.6×250 mm) は野村化学株式会社 (東京, 日本) から購入した。Vivaspin 500 (5kDa MWCO) は GE Healthcare Life Science

(Buckinghamshire, UK) から購入した。透析膜 (size 30/32) は三光純薬株式会社から購入した。遠心式限外濾過フィルターの Amicon® Ultra-0.5 (3 kDa) は Millipore Corp. (Darmstadt, Germany) から購入した。各試薬は各社の特級または同等の品質のものを用いた。

## 2. 3 実験動物

実験動物は日本エスエルシー株式会社 (静岡, 日本) から購入した雄性 Slc: ddY マウスおよび雄性 Slc: ICR マウスを用いた。マウスは飼育室で温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 時間の明暗周期 (明期 8:00 – 20:00) とし、餌と水は自由摂取とした。餌にはラボ MR ストック (日本農産株式会社, 横浜, 日本) を使用し、水は水道水を与えた。実験は 4 日間以上予備飼育をしたのち行った。解剖または全血採血はインフルラン過剰吸入による安楽死の後に実施した。本研究では、東京海洋大学動物実験等取扱規則 (平成 21 年 5 月 14 日) を遵守し実験を行った。

## 2. 4 無水メルカプトリシス法による多糖構成糖の分析

### 2. 4. 1 無水メルカプトリシス反応

Hama *et al.*, 1999 の方法を参考にし、ポルフィランを含む多糖の検出の為、無水メルカプトリシス法を用いた。反応溶媒としてエタンチオール (EtSH) を使用し、酸性条件下で多糖から各構成単糖をジエチルジチオアセタール誘導体として遊離させた。ポルフィランの構成糖の一つであるアンヒドロガラクトース (AG) は一般的な酸加水分解などで容易に破壊されてしまうが、本方法であれば定量的に分析できるとされている。サンプル 100  $\mu\text{g}$  に内部標準として L-アラビノースを 20  $\mu\text{g}$  加えて一晩凍結乾燥後、2 mL の 5-10% HCl/[EtSH-MeOH (2/1, v/v)] を加えて密封した状態で  $60^\circ\text{C}$  で 6 時間加熱し、構成糖を遊離させた。反応後、減圧乾固、窒素ガスにより乾燥させ反応溶媒の除去を行った。得られた反応物を 500  $\mu\text{L}$  の蒸留水に溶かし、その内 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に供した。構成糖の定量にはガラクトースを同様に処理して作成した検量線を用いた。

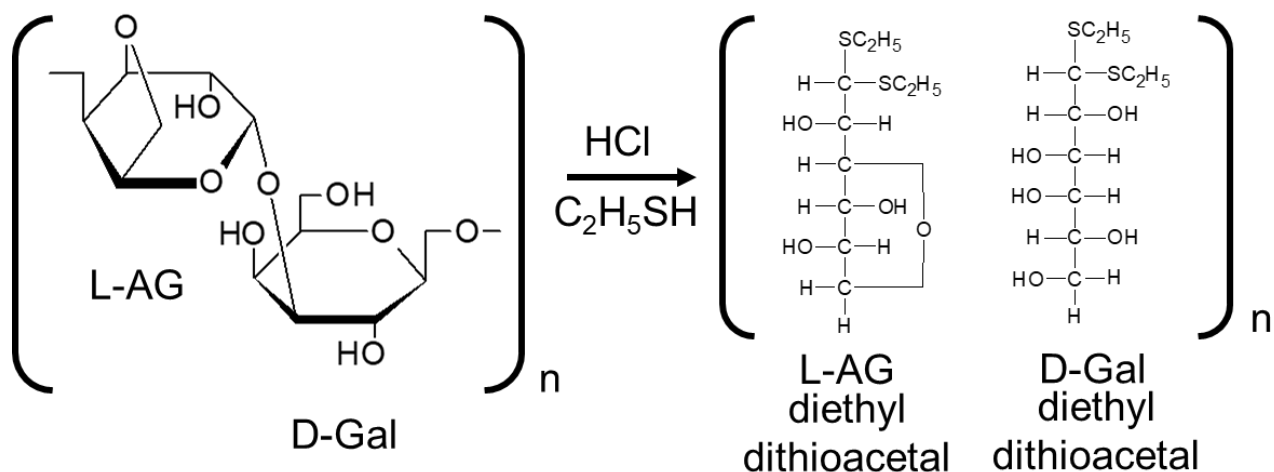


Fig. 2-1 Mechanism of anhydrous mercaptolysis (Hama *et al.*, 1999)

AG: anhydrogalactose, Gal: galactose

#### 2. 4. 2 逆相高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析法による遊離単糖誘導体の分析

無水メルカプトリシス反応により得られた各遊離単糖のジエチルジチオアセタール誘導体の分析を逆相 HPLC 法により行った。分析条件は特に記載のない限り、Table 2-1 に示した通りである。ポンプとして LC-10AS (島津製作所) を、UV-Vis 検出器として SPD-10AV (島津製作所) を使用した。カラムとして高純度シリカゲルベース逆相カラム Develosil<sup>®</sup> RP-AQUEOUS-AR-5 (4.6×250 mm) を使用した。

Table 2-1. HPLC condition

Column	Develosil RPAQUEOUS-AR-5 4.6×250 mm
Eluent A	Water
Eluent B	Acetonitrile
Flow rate	1 mL/min
Column temp	35°C
Detection wavelength	215 nm (range: 0.001)
Injection volume	10 μL

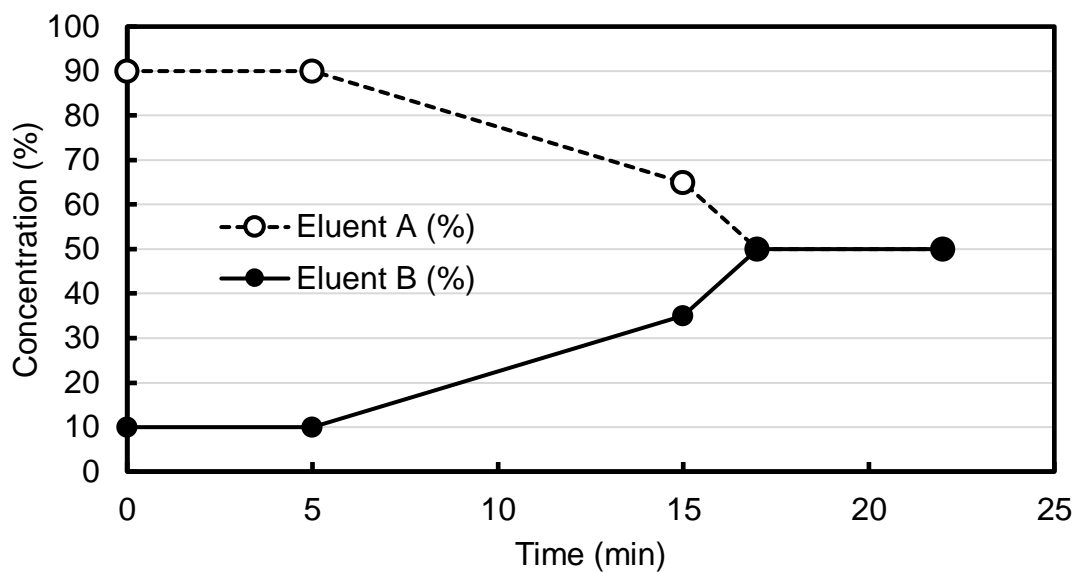


Fig. 2-2 Gradient elution pattern in HPLC

無水メルカプトリシス反応で得られた反応物をより詳細に分析するため、ジエチルジチオアセタール誘導体のピークの分析をLC/MSにより行った。分析条件はTable 2-2に示した通りである。ポンプとしてLC-20AD（島津製作所）を、UV-Vis検出器としてSPD-M20A（島津製作所）を使用した。カラムとしてDevelosil® ODS-HG-5（2.5×250 mm）を使用した。質量分析器としてLCMS-2010 EV（島津製作所）を使用した。

Table 2-2. LC/MS condition

LC condition	
Column	Develosil ODS-HG-5 2.5×250 mm
Eluent A	water
Eluent B	acetonitrile
Flow rate	0.1 mL/min
Column temperature	35°C
Detector	SPD-M20A (diode array detector)
Injection volume	10 $\mu$ L
MS condition	
Ionization mode	ESI negative
Scan	50 - 1000
Capillary voltage	1200 V
Drying gas temperature	250°C
Vaporizer temperature	300°C
Nebulizer gas flow rate	1.5 L/min

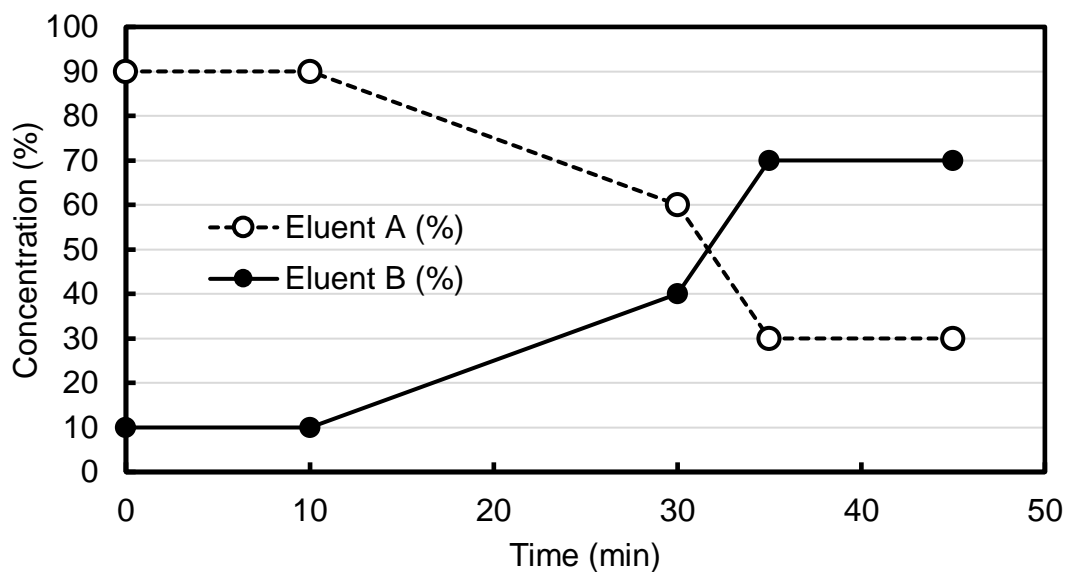


Fig. 2-3 Gradient elution pattern in LC/MS

## 2. 5 マウスに対するサンプル経口投与後の血中多糖構成糖の測定

マウスに対しサンプルを胃ゾンデで経口投与し、糖類の血中への移行を確認するため、一定時間後もしくは経時的に血液を EDTA 処理したチューブに採取した。ただちに 8000 rpm で 3 分間遠心分離し、得られた血漿を用いて、無水メルカプトリシス法により血漿中のガラクトースの定量を行った。



反応に用いる多糖成分を抽出するための血漿の処理方法は各実験の説明で示した。

### 2. 5. 1 ガラクトース経口投与後の血中濃度の測定

多糖のポルフィランを経口投与した場合と比較するため、単糖のガラクトースの経口投与後のガラクトースの血中濃度の変化を観察した。雄性 ddY マウス（8 匹，体重 39.21 – 47.75 g）にガラクトースを投与（1000 mg / kg-body weight: BW）し，投与後 0, 0.5, 1, 3 時間後に尾静脈から採血した。得られた血漿 40  $\mu$ L に L-アラビノース 50  $\mu$ g を加え攪拌後，3 倍量の EtOH を加えて 1 時間，氷冷した。氷冷後，8000 rpm，3 分間遠心分離し，得られた上清をバイアル瓶に移した。また，残った沈殿は 75% EtOH 360  $\mu$ L で洗浄し，再び遠心分離して得られた洗浄液を上清と同じバイアル瓶へ加えた。得られた上清は凍結乾燥機で一晩乾燥させた後，定量を行った。

### 2. 5. 2 ポルフィラン経口投与後の血中濃度の測定

ポルフィランの体内への移行を確認するため，ノリ熱水抽出物を経口投与し血中のガラクトース濃度の変化を観察した。雄性 ddY マウス（16 匹，体重 33.32 - 46.41 g）にノリ熱水抽出物投与（300 mg/kg-BW）し，0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 時間後に下大静脈および心臓から採血した。得られた血漿に 3 倍量の EtOH を加えて 1 時間，氷冷した。氷冷後，4000 rpm で 6 分間遠心分離して上清を除き，血漿の 3 倍量の 80% EtOH で沈殿を洗浄した。再び 4000 rpm で 6 分間遠心分離して上清を除いた後，沈殿に血漿の 10 倍量の熱水を加えて熱水抽出を行った。1 回目は 60°C で 2 時間，2 回目は 70°C で 2 時間行った。熱水抽出後，9000 rpm で 3 分間遠心分離し，上清をバイアル瓶へ移した。得られた上清は一晩凍結乾燥した後，定量を行った。

### 2. 5. 3 血液中のポルフィラン抽出方法の検討

血液由来の夾雑物を除き，ポルフィランの定量性を向上させるために抽出方法を検討した。血液に粗ポルフィランを加え，遠心分離して得られた血漿を用いて以下の 5 つの抽出方法を検討した。

- ・方法 1 (EtOH treat) : 血漿に終濃度が 60% となるようにエタノールを加えて 1 時間氷冷した。氷冷後，8000 rpm で 3 分間遠心分離し，得られた沈殿をポルフィランの分析に使用した。
- ・方法 2 (MeOH treat) : 方法 1 のエタノールの代わりにメタノールを用いた。

- ・方法 3 (EtOH + HW treat) : 方法 1 で得られた沈殿に蒸留水を加えて 70°C で 2 時間熱水抽出を行った。得られた熱水抽出物をポルフィランの分析に使用した。
- ・方法 4 (MeOH + HW treat) : 方法 3 で用いたエタノールの代わりにメタノールを用いた。
- ・方法 5 (Sodium acetate treat) : 血漿に同量の 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) と終濃度が 38% となるようにエタノールを加えて 1 時間氷冷した。氷冷後, 8000 rpm で 3 分間遠心分離し, 得られた上清に終濃度が 60% となるようにエタノールをさらに加えた。遠心分離して得られた沈殿をポルフィランの分析に使用した。

#### 2. 5. 4 血液中単糖の除去方法の検討

血液中に存在する内因性ガラクトースの除去方法としてエタノールを用いた方法と限外濾過を用いた方法の 2 つを検討した。

エタノールを用いた方法 (EtOH treat) : 血漿 40  $\mu$ L にガラクトース 50  $\mu$ L と内部標準としてアラビノースを 50  $\mu$ g 加えた。これに EtOH を 420  $\mu$ L 加え, 1 時間氷冷した。氷冷後, 8000 rpm で 3 分間遠心分離し, 上清を回収した。沈殿は 75%EtOH で洗浄した。得られた上清を凍結乾燥後に無水メルカプトリシス反応により単糖の誘導化を行い, HPLC にてガラクトースの定量を行った。

限外濾過を用いた方法 (Ultrafiltration treat) : 血漿 40  $\mu$ L にガラクトース 50  $\mu$ L と内部標準としてアラビノースを 50  $\mu$ g 加えた。これを限外濾過フィルターに移し (分画分子量 5000), 11000 rpm で 25 分間遠心した。得られたろ液を凍結乾燥後に無水メルカプトリシス反応により単糖の誘導化を行い, HPLC にてガラクトースの定量を行った。得られたガラクトースの定量値から各方法におけるガラクトースの回収率を計算した。

#### 2. 5. 5 ポルフィランのマウス血液中への移行の確認

ポルフィランの体内への移行の有無を再度確認するため, 粗ポルフィラン経口投与後に血中のガラクトース濃度およびポルフィランの構成糖を測定した。雄性 ddY マウス (7 匹, 体重 41.43 – 48.46 g), 粗ポルフィランを投与 (300 mg/kg-BW) し, 3 時間後に下大静脈および心臓から採血した。得られた血漿を 2. 5. 3 で示した Sodium acetate treat の方法に限外濾過の過程を加え, 抽出を行った。得られたサンプルにアラビノース 20  $\mu$ g を加えて一晩凍結乾燥した後, 定量を行った。

## 2. 5. 6 ポルフィラン経口投与後の血中濃度の経時変化

2. 5. 2の実験と同様にマウスに対して粗ポルフィランを経口投与し、構成糖であるガラクトースの血中濃度の変化を確認した。雄性 ddY マウス（6 週齢，体重 29.47 – 32.8 g）30 匹を粗ポルフィラン投与群（粗ポルフィラン 300 mg/kg-BW 投与）と Control 群（蒸留水投与）に分けた。投与 0.5, 3, 6, 24 時間後（各時間 6 匹）に下大静脈および心臓から血液を採取した。得られた血液から 2. 5. 5 と同様にして抽出操作を行い，定量を行った。

## 2. 6 ポルフィラン飲水投与によるマウス腸管内への影響

マウスに対しノリ熱水抽出物から得られたエタノール沈殿画分（NEP）を飲水投与し，腸管内に与える影響について調査した。ICR マウス（6 週齢，体重 30.45 – 35.55 g）を購入後，30 匹のマウスを各群間の平均体重に差が生じないように群分けを実施し，各群 6 匹として Control 群（水道水飲水），2% DSS 群，2% NEP 群，4% NEP 群，2% DSS + 2% NEP 群の 5 群に分け，それぞれ水道水に溶かしたサンプルを連日自由飲水させた。実験期間中，餌は予備飼育期間と同様にラボ MR ストックを与え，毎日体重と糞便の様子を観察し，腸管からの出血および下痢の程度を評価し Disease activity index (DAI) スコアを計算した。DAI スコアの評価方法については Xu *et al.*, 2009 と Sha *et al.*, 2013 の方法を参考にした (Table 2-3)。

Table 2-3. Scoring of disease activity index (DAI)

Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Rectal bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1 - 5	Loose stools –	Slight bleeding –
2	6 - 10	Loose stools ±	Slight bleeding ±
3	11 - 15	Loose stools +	Slight bleeding +
4	> 15	Diarrhea	Gross bleeding

DAI score is the combined scores of weight loss, stool consistency and rectal bleeding divided by 3.

2% DSS 群のすべてのマウスで血便および DAI スコアの有意な上昇が確認された後、一晩絶食後にマウスの解剖を行い、血液と各臓器を採取した。血液は下大静脈および心臓から採取し、無水メルカプトリシス法によりポルフィランの検出を行った。脾臓は重量の測定を行った。大腸と盲腸は長さの測定を行い、重量の測定の際には大腸は内容物を生理食塩水で洗い流し、盲腸は内容物が入ったまま測定した。

## 2. 7 統計解析

各値は平均値±標準偏差または標準誤差で表した。有意差検定は Dunnett's 法または Tukey-Kramer 法で評価し、統計的有意水準を  $p < 0.05$  として評価した。

## 第 3 章 結果および考察

### 3. 1 無水メルカプトリシス法による多糖構成糖の検出とガラクトース検量線の作成

無水メルカプトリシス法により得られたガラクトース (Gal) 検量線は、アラビノース (Ara) を内部標準とした内標準法により定量した (Fig. 3-1)。同法により各抽出物の構成糖組成の分析を行い、その結果を Table 3-1 に示した。この定量値から計算した各抽出物のポルフィラン含量は粗ポルフィランで  $49.44 \pm 0.87\%$ 、NEP で  $40.71 \pm 5.68\%$ であった (Table 3-1)。

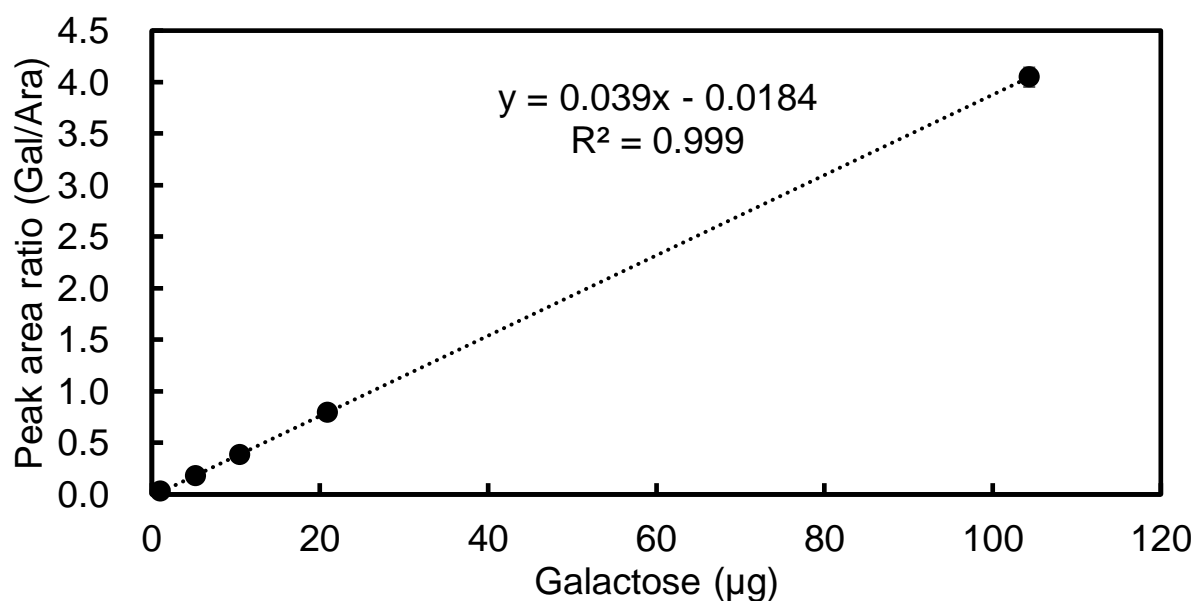


Fig. 3-1 Galactose calibration curve

Table 3-1. Porphyrin contents in sample analyzed by anhydrous mercaptolysis

Extracts	Monosaccharide ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g-Ext.}$ )		Porphyrin ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g-Ext.}$ )	
	Galactose	Anhydrogalactose*		
Crude porphyrin	1	28.62	21.84	50.46
	2	28.57	20.11	48.68
	3	32.42	16.15	48.57
	Average	29.87	19.37	49.44
	$\pm\text{SD}$	1.80	2.38	0.87
Nori EtOH precipitate (NEP)	1	30.84	14.30	45.13
	2	27.34	16.96	44.30
	3	21.60	11.09	32.68
	Average	26.59	14.12	40.71
	$\pm\text{SD}$	3.81	2.40	5.68

\*Anhydrogalactose Values are expressed as galactose equivalent.

### 3. 2 マウスに対するサンプル経口投与後の血中構成糖の分析

#### 3. 2. 1 ガラクトース経口投与後の血中濃度の測定

単糖のガラクトースの経口投与後のガラクトースの血中濃度の変化を観察した (Fig. 3-2, Table 3-2). その結果, ガラクトースの血中濃度は投与後 30 分後に最も高くなり, 3 時間後には投与前と同程度まで減少した.

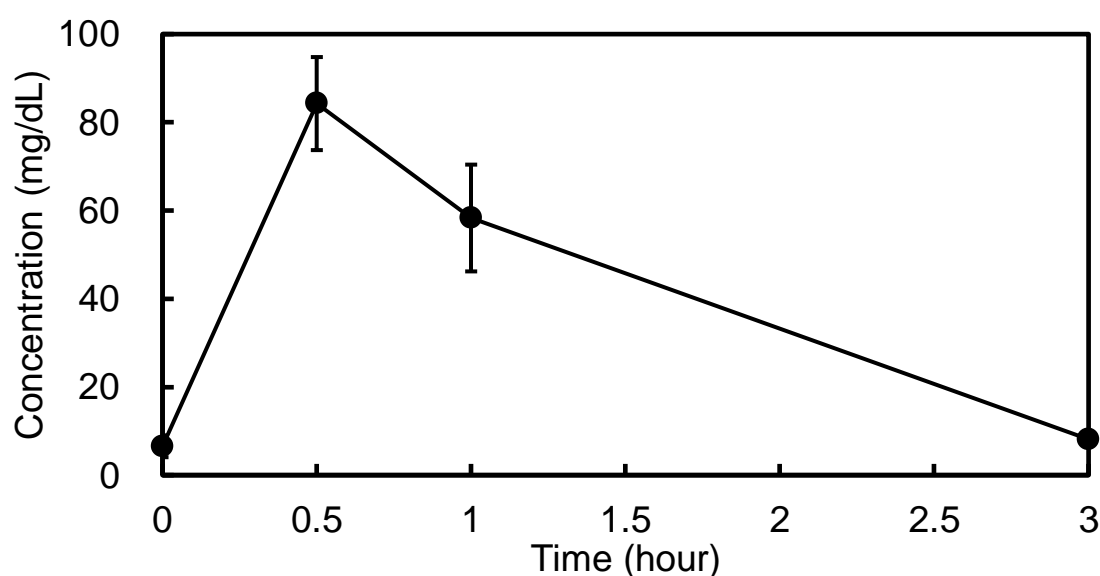


Fig. 3-2 Time course of galactose concentration in mice plasma after oral administrated galactose 1000 mg/kg-BW ( $n = 8$ , mean  $\pm$  SE).

Table 3-2. Galactose concentration in plasma ( $n = 8$ )

Time (hour)	Conc. (mg/dL)	$\pm$ SE
0	7.5	0.2
0.5	84.2	10.5
1	58.3	12.1
3	8.1	0.7

### 3. 2. 2 ポルフィラン経口投与後の血中濃度の測定

ノリ熱水抽出物を経口投与し血中のガラクトース濃度の変化を観察した。今回、内部標準物質の添加は無水メルカプトリシス反応における反応率の低下が懸念され、ポルフィランの構成糖の検出を優先するため行わなかった。そのため、結果 (Table 3-3) は血漿 1  $\mu$ L あたりのガラクトースのピーク面積の変化で示している。

結果、血漿中のガラクトース濃度は検出されたものの、Table 3-3 に示したように、ガラクトースおよびアンヒドロガラクトースの検出ができていない検体が多くあった。これらの検体の HPLC のクロマトグラム (Fig. 3-3) からは多くの夾雑物のピークが見られ、構成糖の検出及び定量に著しく影響していることが考えられた。

Table 3-3. Area ratio of galactose and anhydro galactose in plasma

Sample	Galactose (peak area/ $\mu$ L - plasma)	Anhydrogalactose* (peak area/ $\mu$ L - plasma)
0 hour-1	ND	ND
0 hour-2	2.48	ND
0.5 hour-1	ND	ND
0.5 hour-2	8.44	0.46
1 hour-1	ND	ND
1 hour-2	0.54	ND
3 hour-1	30.50	2.25
3 hour-2	18.89	ND
6 hour-1	23.70	0.72
6 hour-2	6.28	ND
9 hour-1	15.03	ND
9 hour-2	8.60	0.68
12 hour-1	9.29	0.46
12 hour-2	9.38	0.70
24 hour-1	7.21	ND
24 hour-2	17.69	1.94

ND: Not detected, \*Anhydrogalactose Values are mean galactose equivalent.

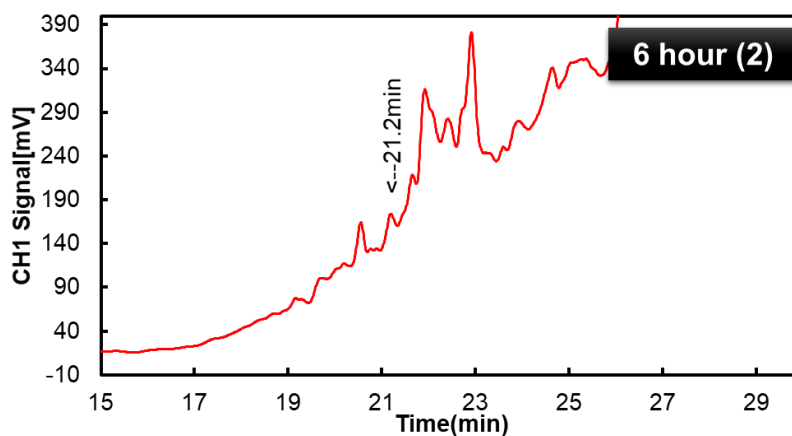


Fig. 3-3 Chromatogram of plasma sample (6 hour-2) after anhydrous mercaptolysis (Galactose: 21.1 min)

### 3. 2. 3 血液中のポルフィラン抽出方法の検討

血液由来の夾雑物を除き、ポルフィランの定量性を向上させるために2. 5. 3に示した各種の抽出方法を検討した。その結果、ポルフィランの回収率はEtOH treatが最も高く、次いでSodium acetate treatだった。

Table 3-4. Porphyrin recovery rate in different extraction methods ( $n = 3$ )

	Recovery rate (%)	±SD
EtOH treat	52.2	21.1
MeOH treat	45.9	10.5
EtOH + HW treat	40.1	24.3
MeOH + HW treat	16.1	6.5
Sodium acetate treat	47.2	13.1

次いで各抽出方法における内部標準のアラビノースのピーク面積から、アラビノースの反応率を算出した (Table 3-5)。Sodium acetate treatの反応率が約100%なのに対し、そのほかの方法は40%を下回った。Sodium acetate treatでは、終濃度38%でのエタノール沈殿により大部分の血中タンパク質などの成分を除くことができたために反応率が上昇したと考えられる。

Table 3-5. Arabinose reaction rate in different extraction methods ( $n = 3$ )

	Reaction rate (%)	±SD
EtOH treat	21.3	10.7
MeOH treat	27.0	9.7
EtOH + HW treat	30.2	13.0
MeOH + HW treat	37.2	17.4
Sodium acetate treat	103.4	14.4

以上の結果から2. 5. 3に示した抽出方法のうち、Sodium acetate treatを血液からのポルフィランの抽出方法として採用した。



### 3. 2. 4 血液中単糖の除去方法の検討

血液中の内因性ガラクトースの除去方法（方法 2. 5. 4）として検討したエタノールを用いた方法と限外濾過を用いた方法は、どちらもほぼすべての単糖を除去することができることが分かった。EtOH treat で回収率が 100%を超えたが、これは内因性のガラクトースを含んでいるためだと考えられる。Ultrafiltration treat は濃縮を繰り返すことでさらに単糖の回収率を上げることができると考えられる。また、限外濾過を行うことで一定の分子量以下の物質を除けるため、多糖（もしくはオリゴ糖）と単糖の区別をすることができる。そこで、血液サンプル処理の過程で限外濾過を行うこととした。

Table 3-6. Recovery rate of galactose and arabinose in different treatment ( $n=3$ )

	Galactose		Arabinose	
	Recovery (%)	±SD	Recovery (%)	±SD
EtOH treat	116.3	2.7	106.9	3.4
Ultrafiltration treat	100.2	9.7	93.6	7.3

### 3. 2. 5 ポルフィランのマウス血液中への移行の確認

ポルフィランの体内への移行の有無を再度確認するため、粗ポルフィラン経口投与後に血中のガラクトース濃度およびポルフィランの構成糖を測定した。その結果、ポルフィラン由来と考えられるガラクトースが  $2.63 \pm 0.27$  mg/mL、アンヒドロガラクトースが  $0.17 \pm 0.01$  mg/mL の濃度でそれぞれ血漿中に確認された。ポルフィランのマウスへの投与量に対する血中への移行率を各構成糖で見ると、ガラクトースで  $2.46 \pm 0.25\%$ 、アンヒドロガラクトースで  $0.25 \pm 0.02\%$ であった。

Table 3-7. Galactose and anhydro galactose concentration and absorption rate in plasma after oral administrated crude porphyran to mice

Mice	Concentration in plasma (mg/dL)		Absorption rate (%)	
	Galactose	Anhydro galactose	Galactose	Anhydro galactose
1	3.20	0.188	3.00	0.27
2	3.04	0.166	2.85	0.24
3	2.75	0.130	2.58	0.19
4	1.64	0.167	1.53	0.24
5	3.49	0.245	3.27	0.35
6	2.78	0.163	2.60	0.24
7	1.47	0.131	1.38	0.19
Average	2.63	0.17	2.46	0.25
±SE	0.27	0.01	0.25	0.02

### 3. 2. 6 マウスに対するポルフィラン経口投与後の血中濃度の経時変化

予備試験においてマウスに対して粗ポルフィランを経口投与し、構成糖であるガラクトースの血中濃度の変化を確認した結果、さらにポルフィランを投与していないコントロール群においてポルフィラン投与群と同程度のガラクトースが ( $2.63 \pm 0.27$  mg/dL) 検出された (data not shown). このことから、HPLC で検出したガラクトースがポルフィラン由来でないこと、もしくは検出したピークがガラクトースではない可能性が示唆された. そこで、HPLC で検出した血漿サンプル中のピークがガラクトースのジエチルチオアセタール誘導体であるか確認するため、LC/MS による分析を行った.

Table 3-8 に各単糖のジエチルジチオアセタール誘導体を測定し得られた分子イオンと付加イオンの  $m/z$  を示した. Table 3-8 に示した LC の保持時間と  $m/z$  の値からガラクトースの有無を確認したところ、血漿サンプル中にガラクトースのジエチルジチオアセタール誘導体が含まれていることが確認された (Fig. 3-4, Fig. 3-5). 従って、血漿サンプルに含まれるガラクトースがポルフィラン以外のガラクトタン由来である可能性が示唆された.

実験期間中、通常の飼育飼料 (ラボ MR ストック) をマウスに与えていたが、この飼料には小麦粉、大豆、とうもろこし等の植物由来の原材料が含まれている. 植物の細胞壁や細胞外マトリックスにはペクチンやアラビノガラクトタンといったガラクトースを構成糖とする多糖が普遍的に含まれている (円谷・小竹, 2017) ため、これらの多糖が血中に移行した可能性が考えられる. そこで本研究

ではこのベースラインとなるガラクトース量を差し引くことで、血中に移行したポルフィランを検出することとした。

Table 3-8. Molecular ion of diethyl dithioacetal derivatives of monosaccharides

Monosaccharides	Retention time (min)	Molecule	Adduct ion	
			[M-H] <sup>-</sup>	[M+Cl] <sup>-</sup>
Galactose	30.295	286	285	321
Anhydrogalactose	34.411	268	267	303
Arabinose	31.764	256	255	291

確立させた検出方法を用いて、マウスに対して粗ポルフィランを経口投与し、構成糖であるガラクトースの血中濃度の変化を確認した。その結果、血中ガラクトース濃度の経時変化は見られなかった (Fig. 3-6)。

本節では、スサビノリ *Pyropia yezoensis* から抽出した粗ポルフィラン溶液をマウスに対して経口投与し、血液への移行の有無を無水メルカプトリシス法により確認した。ポルフィラン由来ではない血中ガラクトースを差し引いて経口投与後のポルフィランの体内移行の有無を確認したところ、血中ガラクトースの経時変化は見られず、ポルフィラン非投与群とポルフィラン投与群とで血中ガラクトース濃度に差は見られなかったため (Fig. 3-4)、経口投与したポルフィランは血中へ移行しない可能性が高いと結論付けた。

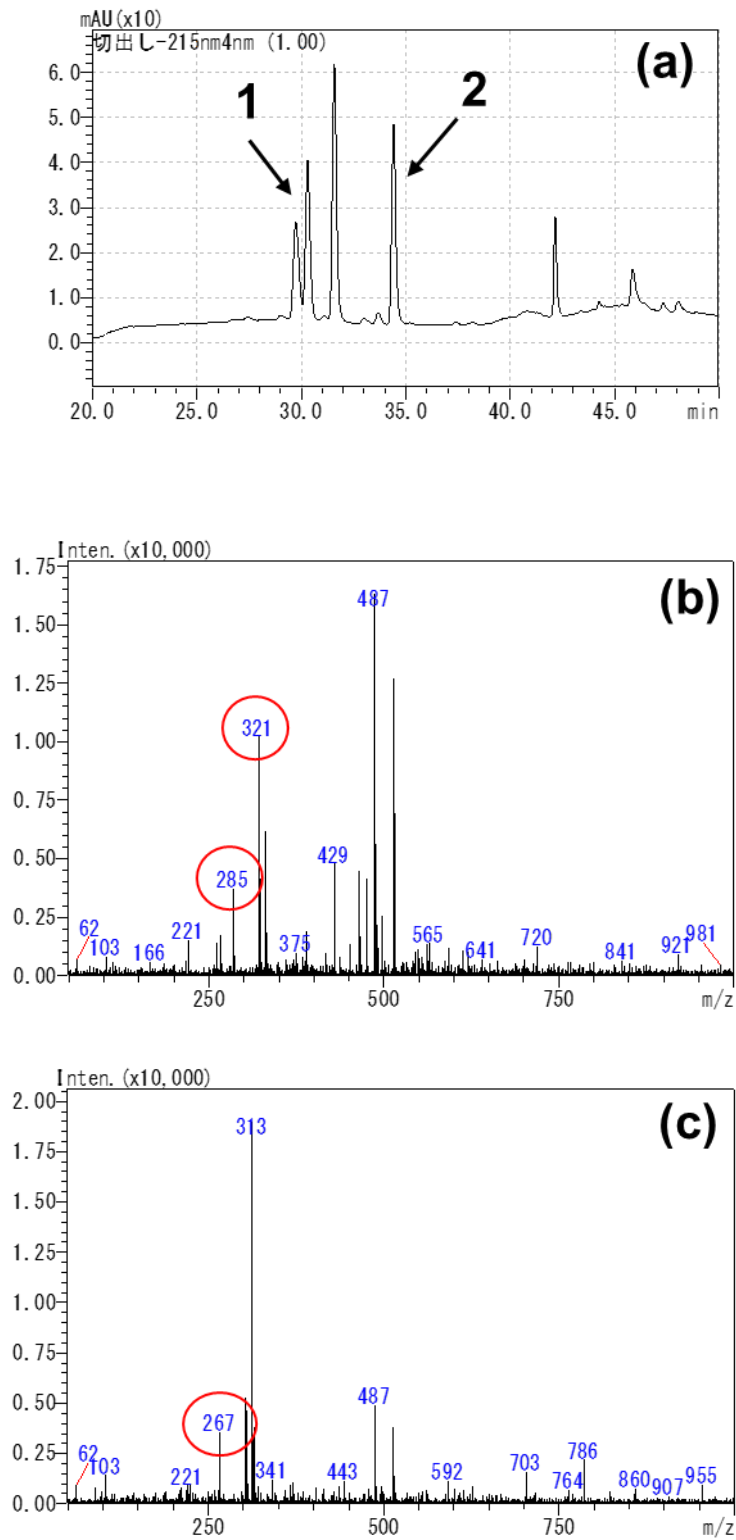


Fig. 3-4 Analysis of diethyl dithioacetal derivatives of galactose and anhydrogalactose from crude porphyrin by LC/MS. (a) chromatogram at 215 nm of crude porphyrin (Retention time: peak 1; 30.295 min, peak 2; 34.411 min). (b) Mass spectrum of peak 1. (c) Mass spectrum of peak 2.

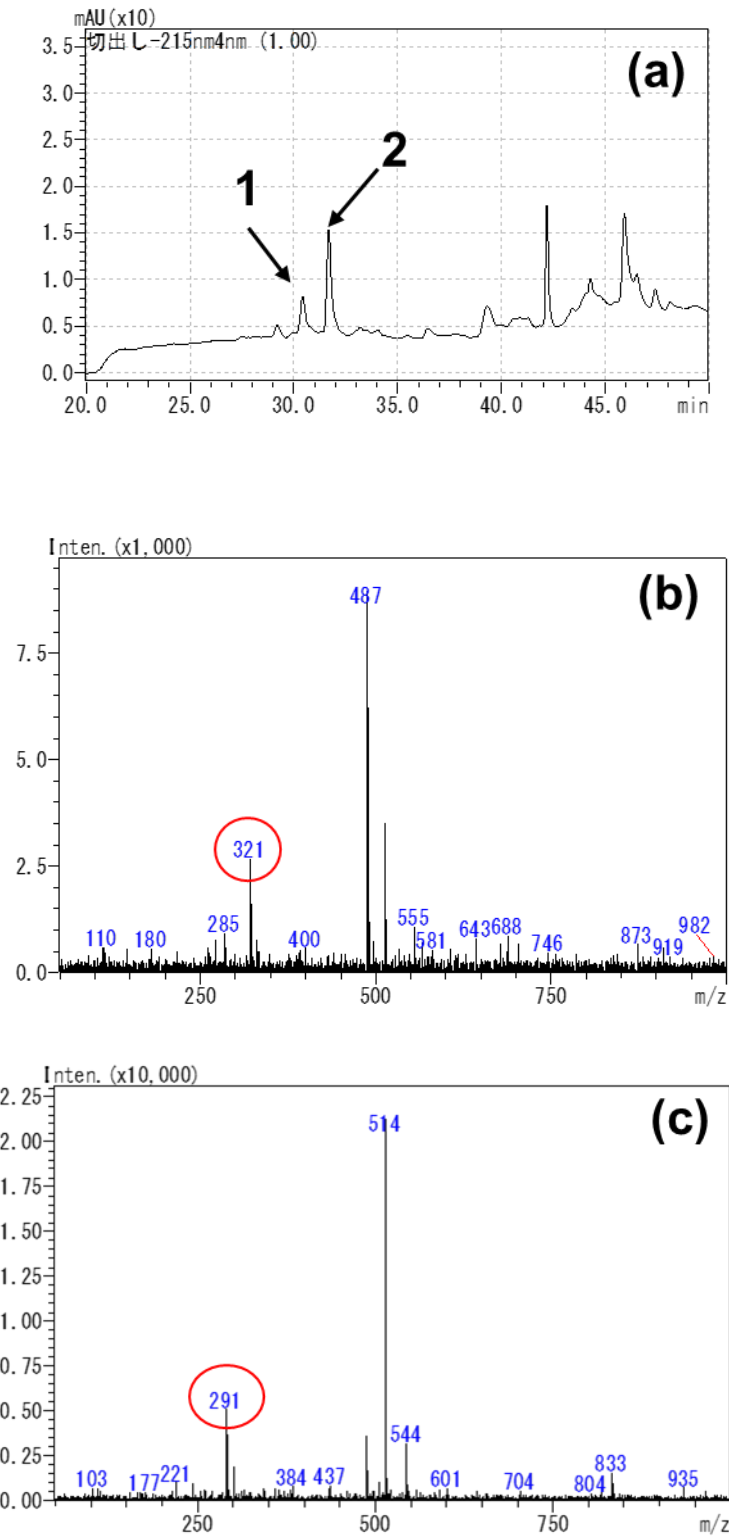


Fig. 3-5 Analysis of diethyl dithioacetal derivatives of galactose and arabinose in plasma sample (No.1 mouse in control group at experiment 3. 7) by LC/MS. (a) chromatogram at 215 nm of plasma sample (Retention time: peak 1; 30.422 min, peak 2; 31.676 min). (b) Mass spectrum of peak 1. (c) Mass spectrum of peak 2.

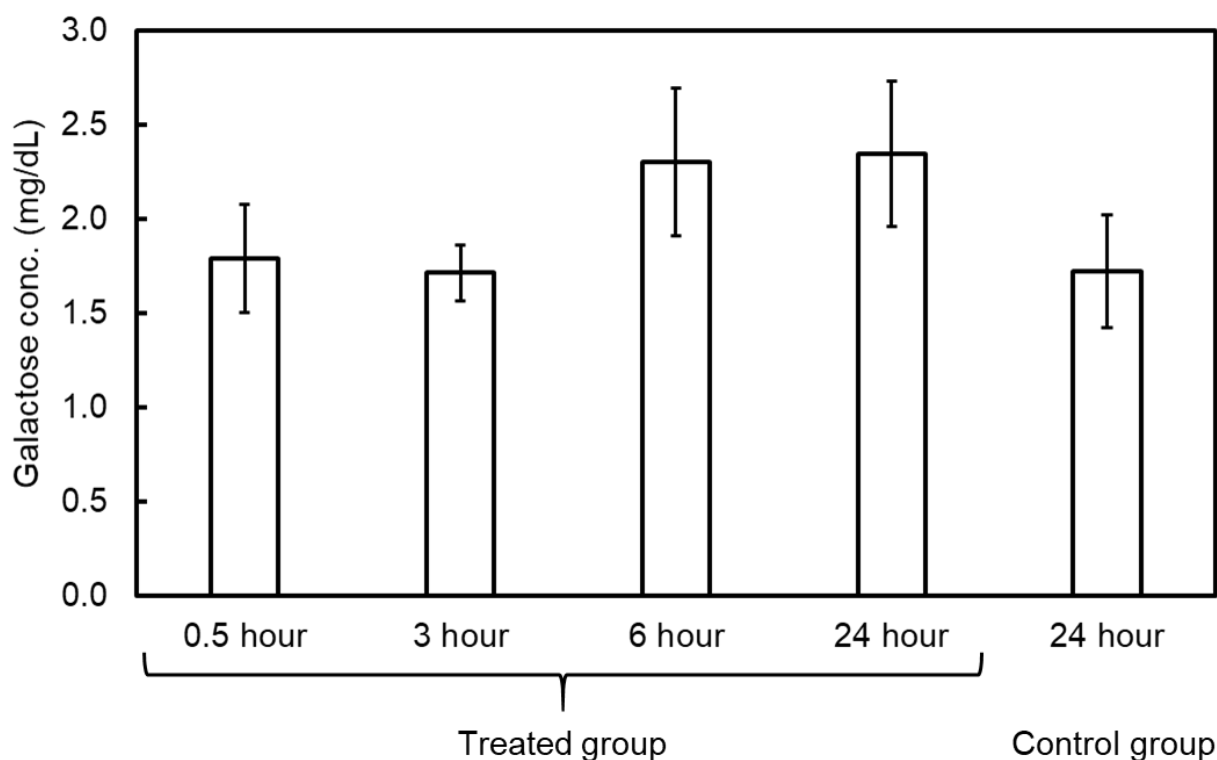


Fig. 3-6 Time course of galactose concentration in plasma after oral administrated crude porphyran or water to mice. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. No significant difference (vs Control, Dunnett's test).

Table 3-9. Time course of galactose concentration in plasma

		Galactose concentration in plasma (mg/dL)	$\pm$ SE
Treated group	0.5 hour	1.79	0.29
	3 hour	1.71	0.15
	6 hour	2.30	0.39
	24 hour	2.35	0.39
Control group	24 hour	1.72	0.30

Treated group: oral administrated crude porphyran, Control group: oral administrated water.

### 3. 3 ポルフィランの飲水投与によるマウス腸管内への影響

ノリ熱水抽出物から得られたエタノール沈殿画分 (NEP) を水道水に溶かし 12 日間マウスに自由飲水させることでポルフィランのマウス腸管内への影響を評価した。

Fig. 3-7 に累積飲水量と累積摂餌量を示した。飼育期間中、群間での差は見られなかった。

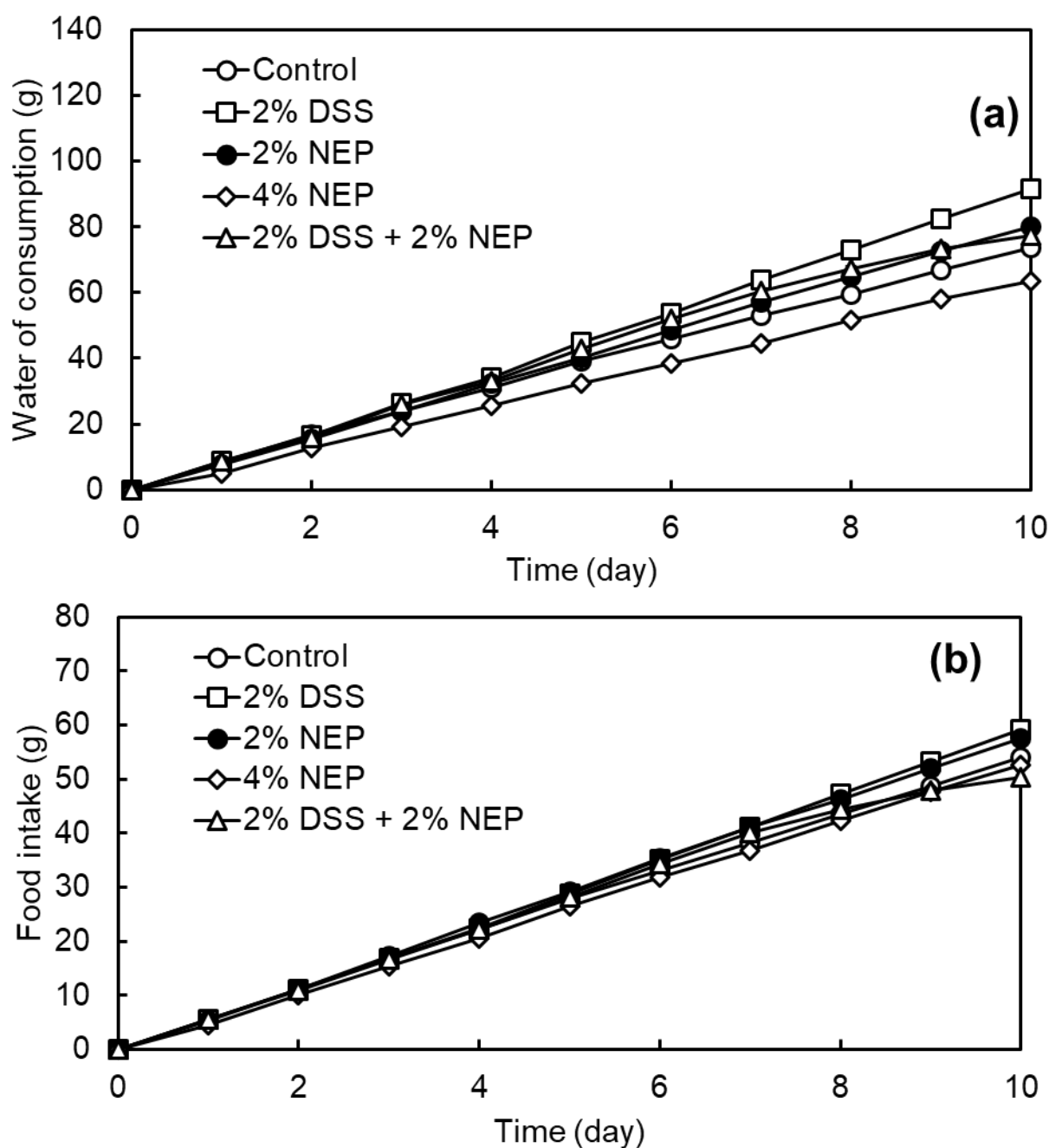


Fig. 3-7 Water consumption (a) and food intake (b) of each group (6 individuals).

体重の変化は Fig. 3-8 に示した。体重は DSS+NEP 群において 8 日目から減少傾向が見られた。また、Table 3-9 に示した通り 10 日目に DSS+NEP 群のみに他群に対する有意な減少が見られた。体重の変化率においても、DSS+NEP 群において 9 日目と 10 日目に実験開始時点からの有意な減少が見られた。

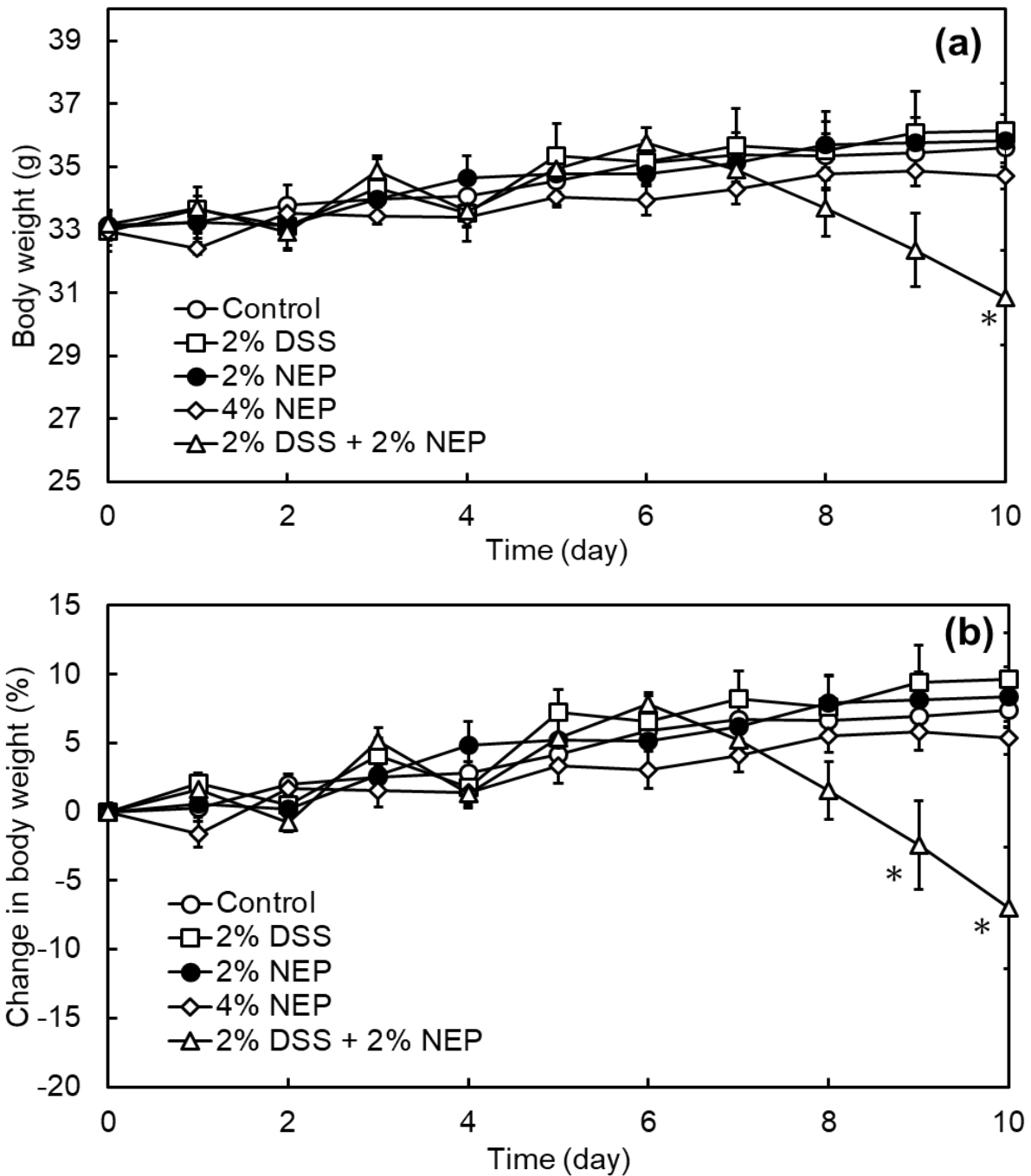


Fig. 3-8 Body weight (a) and Change in body weight (b) of each group. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. \* $p < 0.05$  (vs Control, Dunnett's test).



Table 3-9. Body weight and change in body weight of mice at day 10

	Body weight (g)	Change in body weight (%)
Control	35.60 ± 0.75 <sup>ab</sup>	7.40 ± 1.24 <sup>a</sup>
2% DSS	36.15 ± 1.50 <sup>a</sup>	9.61 ± 3.40 <sup>a</sup>
2% NEP	35.83 ± 0.84 <sup>a</sup>	8.34 ± 2.23 <sup>a</sup>
4% NEP	34.71 ± 0.41 <sup>ab</sup>	5.38 ± 1.20 <sup>ab</sup>
2% DSS + 2% NEP	30.85 ± 1.49 <sup>b</sup>	-6.97 ± 4.42 <sup>b</sup>

Values are the means ± SE of 6 mice. Values not sharing a common letter are significantly different by Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

DAIスコアはFig. 3-9に示した通り、DSS群において6日目から上昇が見られた。症状として糞便が柔らかく、8日目には半分以上のマウスに血便も見られた。9日目にはDSS群のすべてのマウスで血便が見られ、半分以上のマウスで糞便が水分を多く含み、柔らかくなっていた。DSS+NEP群において5日目からDAIスコアの上昇が見られた。症状として3日目にマウスの一匹に血便が見られ、5日目には半分以上のマウスで血便が見られた。6日目以降、血便が悪化していき、糞便は下痢状となった。症状の悪化はDSS群と比べて早く、7日目以降はDAIスコアが0.5を超えた。Table 3-10に示した通りDAIスコアによる評価では10日目には2% DSS+2% NEP群のみが有意な変化を示した。

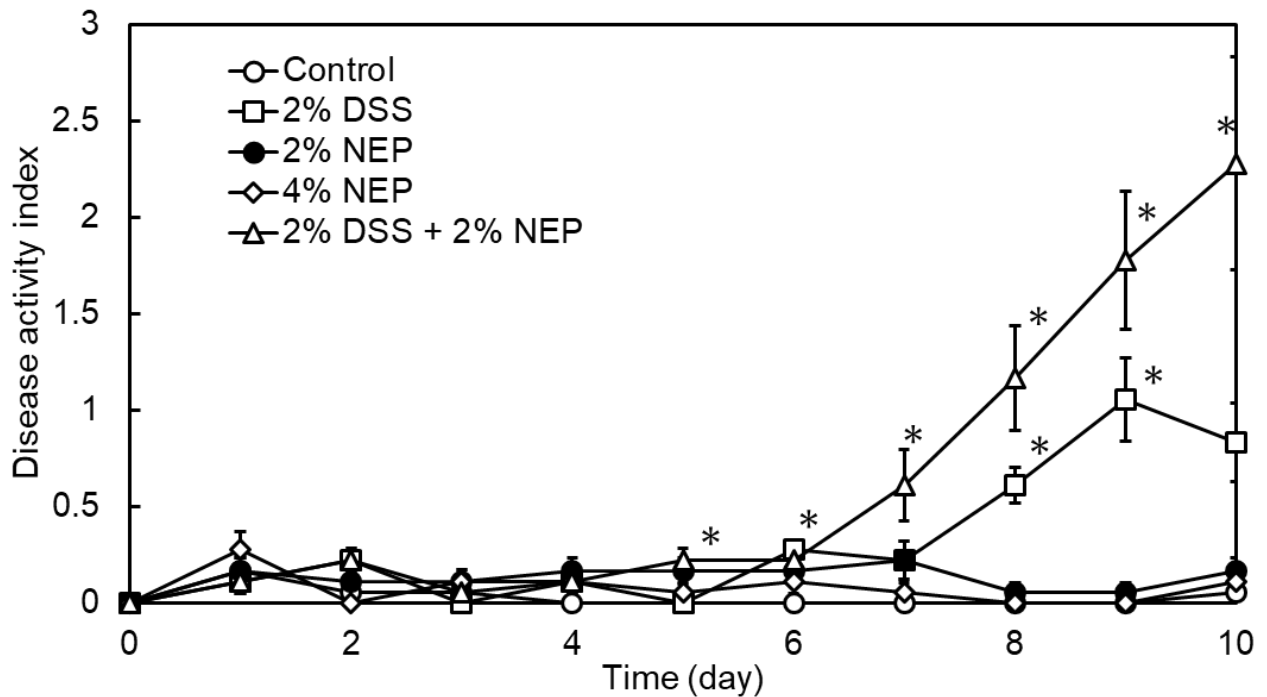


Fig.3-9 DAI score of each group. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. \* $p < 0.05$  (vs Control, Dunnett's test).

Table 3-10. DAI score at day 10

Group	DAI score
Control	0.06 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
2% DSS	0.83 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
2% NEP	0.17 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
4% NEP	0.11 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
2% DSS + 2% NEP	2.28 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>

Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. Values not sharing a common letter are significantly different by Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

大腸の長さは Fig. 3-10 に示した通り、DSS+NEP 群と DSS 群で有意な減少が見られた。また、大腸の長さあたりの重量は Fig. 3-11 に示した通り、DSS+NEP 群と DSS 群で有意な増加が見られた。脾臓重量については Fig. 3-12 に示した通り、DSS+NEP 群と DSS 群で有意な増加が見られた。盲腸の重量を Fig. 3-13 に示した。Control 群に対して有意な差はなかったが、4% NEP 群で増加傾向が見られた。

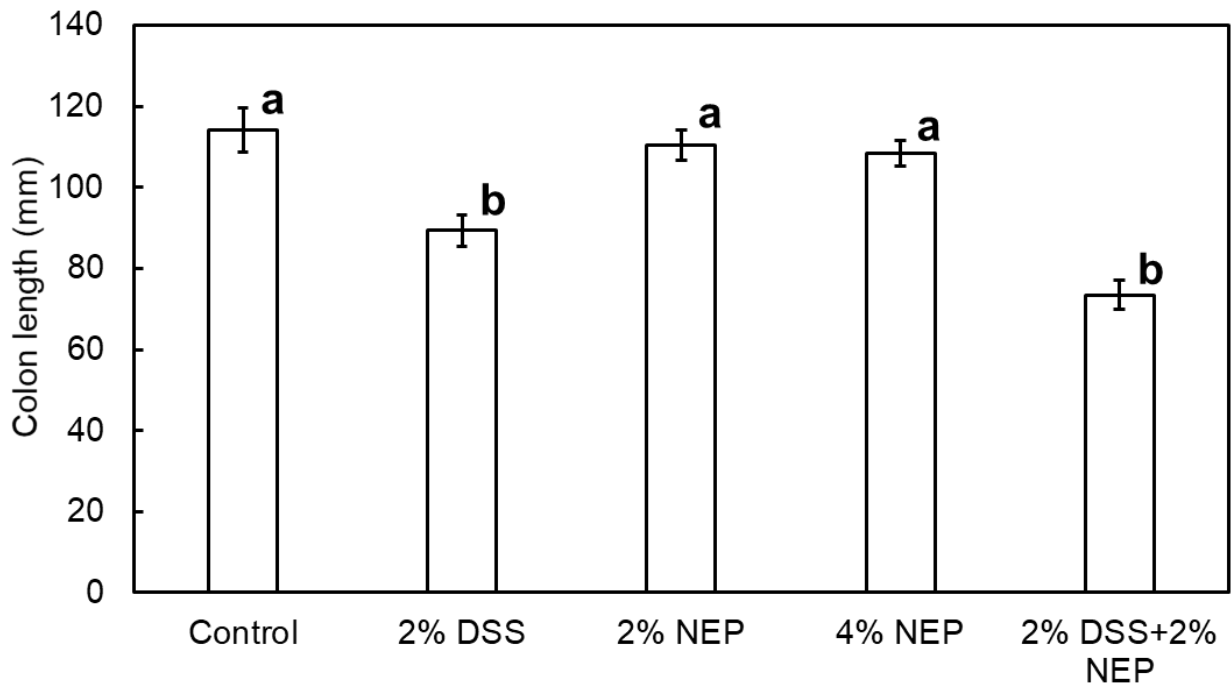


Fig. 3-10 Colon length of each group at day 11. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. Values not sharing a common letter are significantly different by Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

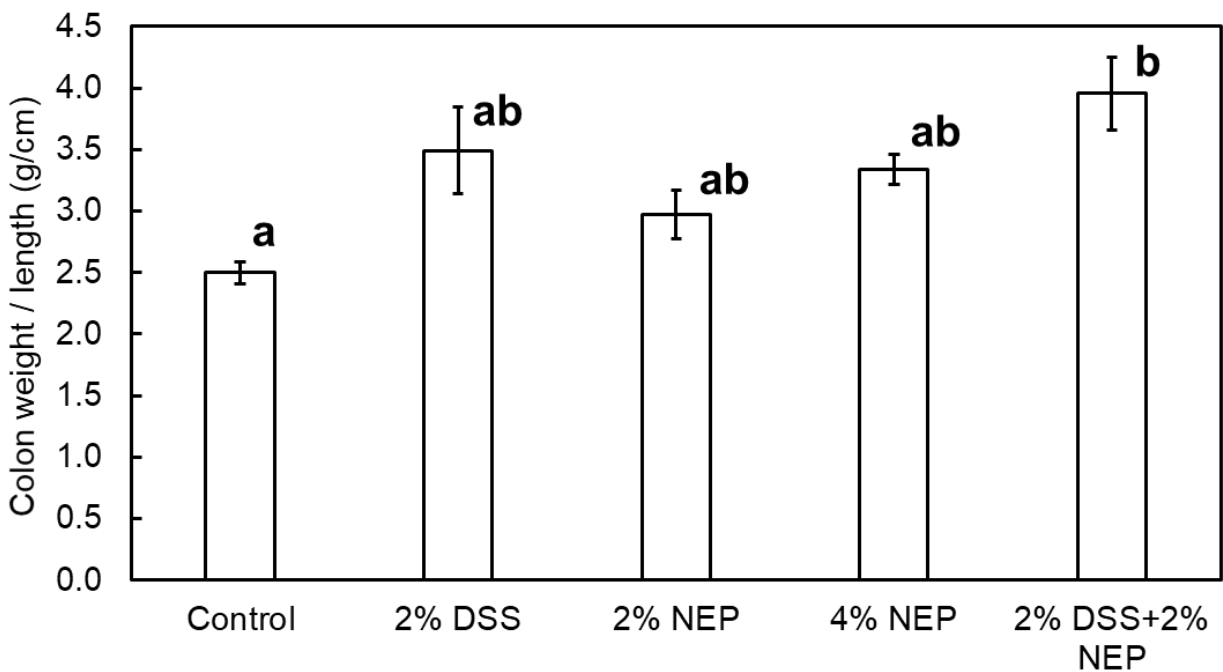


Fig. 3-11 Colon weight / length of each group at day 11. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. Values not sharing a common letter are significantly different by Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

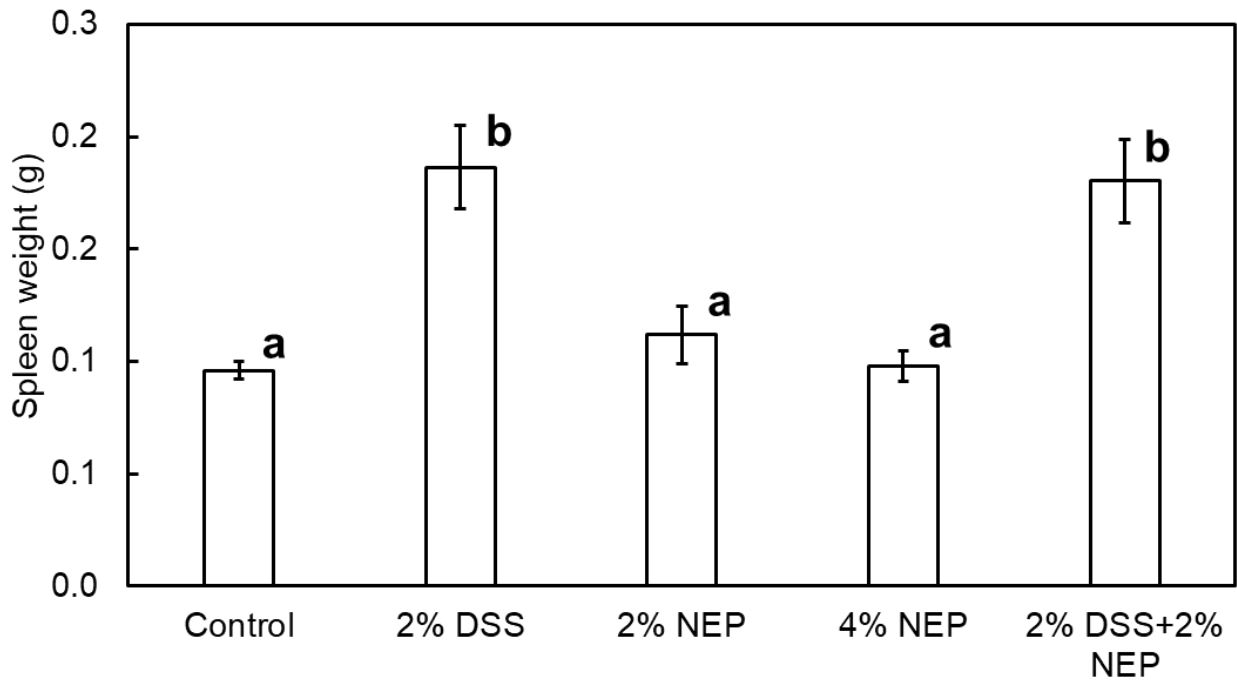


Fig. 3-12 Spleen weight of each group at day 11. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. Values not sharing a common letter are significantly different by Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

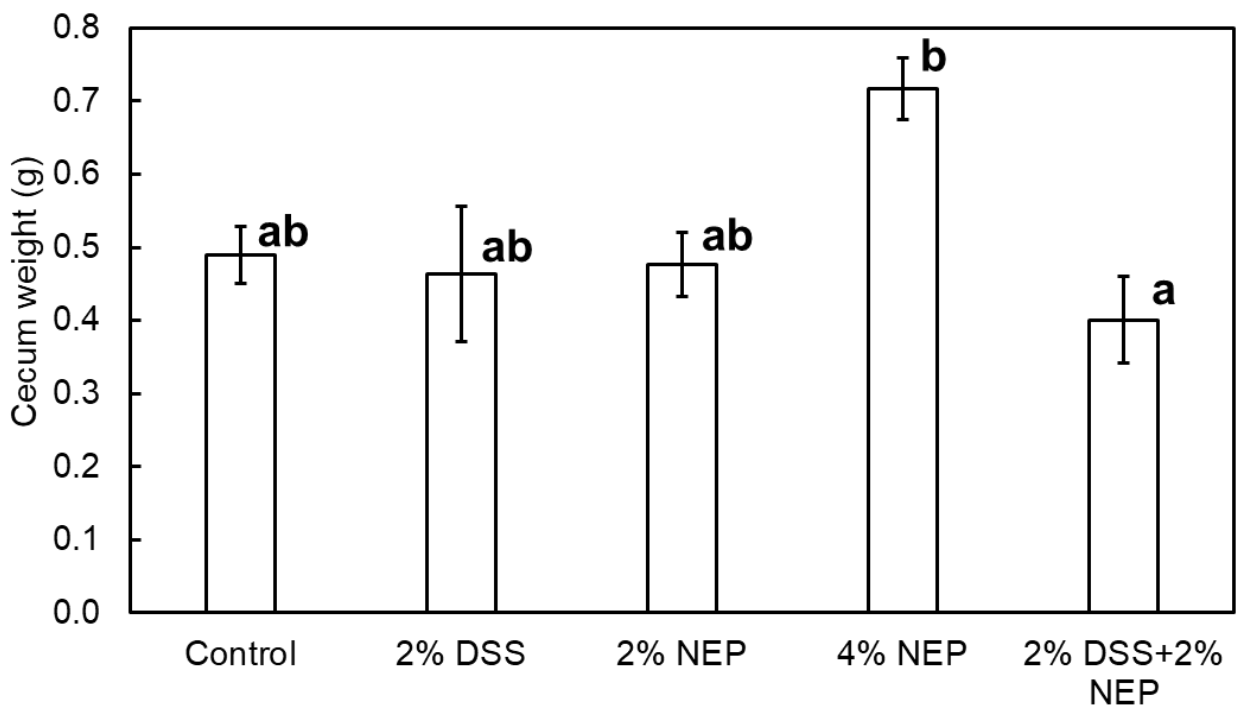


Fig. 3-13 Cecum weight of each group at day 11. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice. Values not sharing a common letter are significantly different by Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ).

血漿中のガラクトース濃度は (Fig 3-14) 群間で有意な差はなかった。また、ポルフィランを投与していない Control 群, DSS 群でもガラクトースが検出されたため, ポルフィラン由来のガラクトースではない可能性が示唆され, マウスへの経口投与後の血中濃度変化と同様にポルフィランは血中へ移行しない可能性が高いことが示唆された。

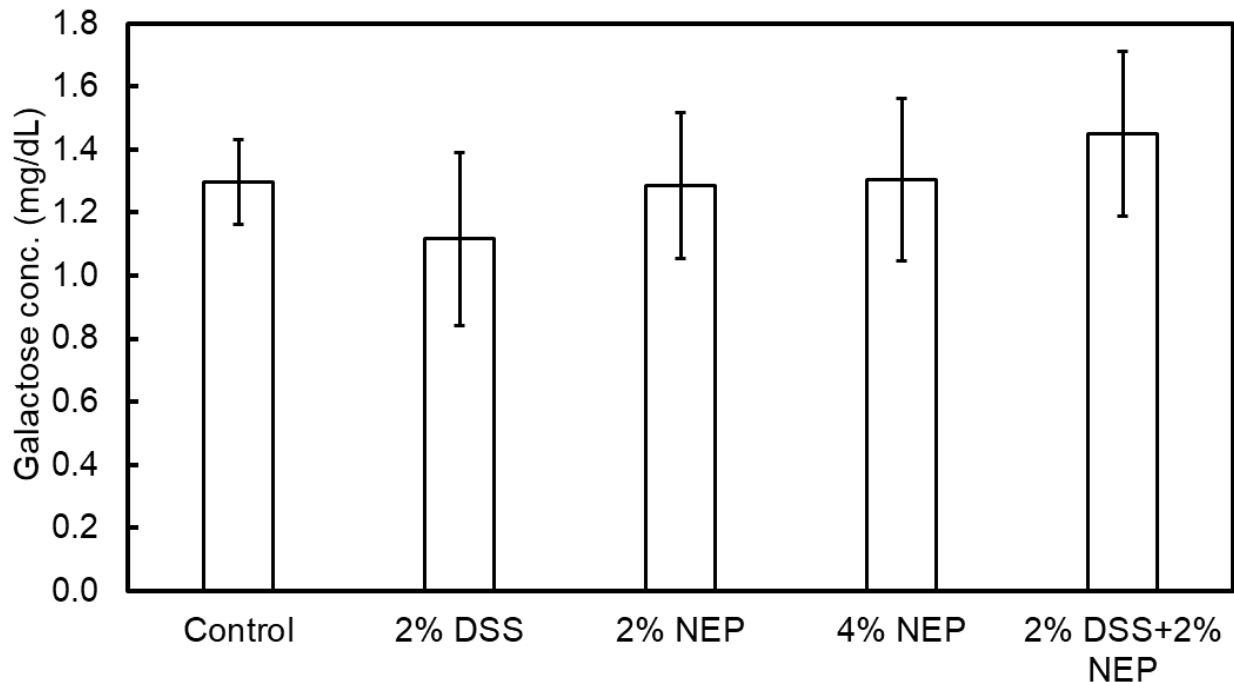


Fig. 3-14 Galactose concentration in plasma at day 11. Values are the means  $\pm$  SE of 6 mice (Control, 2% DSS, 2% NEP) or 5 mice (4% NEP, 2% DSS+2% NEP). No significant difference (vs Control, Dunnett's test).

ポルフィランを含有するノリ熱水抽出物のエタノール沈殿画分 (NEP) を飲水投与し, マウス腸管内への影響を観察してポルフィランの体内吸収の有無を確認した。比較対象として同じ硫酸化多糖である潰瘍性大腸炎を引き起こすデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いた。DSS は大腸上皮細胞のアポトーシスを引き起こし, 細胞周期を停止させることが知られており, これが潰瘍性大腸炎を引き起こすことが示唆されている (Araki *et al.*, 2012, Ling *et al.*,1988)。その結果, DSS を投与した 2 群では体重減少 (Fig. 3-8), 血便や大腸の収縮 (Fig. 3-10) といった大腸炎特有の症状が見られたが, NEP 投与群では見られなかった。ポルフィランは消化管内の酵素や胃液では分解されないため, 大

腸へ容易に到達できると考えられる。本研究の結果においても、ポルフィランの血液への移行は確認されなかったこと、4% NEP 群で盲腸の重量に増加傾向が見られたことから (Fig. 3-13)、小腸で吸収されずに大腸へ到達したと考えられる。

ポルフィランが潰瘍性大腸炎を引き起こすという報告はなく、本研究の結果からも NEP 投与群では引き起こされなかったことから、ポルフィランは硫酸化多糖ではあるが、そのような作用はないと考えられる。今回の実験条件において飲水量とサンプル濃度から算出されるマウス 1 匹が一日に摂取した多糖の量は、DSS については 0.18 g/day、ポルフィランについては 2% NEP 群で 0.06 g/day、4% NEP 群で 0.10 g/day であったため、より高濃度のポルフィランでは大腸炎を惹起する可能性も残る。しかし、引き起こされる潰瘍性大腸炎の症状の程度は DSS の分子量によって異なることが知られている。Araki *et al.*, 2012 は胃で分解を受けた DSS (750 Da ~ 2 kDa) は小腸にて吸収されて血液および各臓器へ移行するが、分解を免れた DSS (5 kDa) が盲腸、大腸へ到達し炎症を引き起こしたことを報告している。また、Kitajima *et al.*, 2000 は 5 kDa よりも 40 kDa の DSS を投与した方が大腸の下部へと到達しており、より深刻な症状をもたらす事を報告している。しかし同時に、500 kDa の DSS では炎症は見られなかったとしている。このことから、大腸炎を引き起こすには適当な分子量の範囲が重要であることが示唆されている。ポルフィランの分子量は数十万程度であり、本研究で用いた粗ポルフィランのおよそ 30% は分子量 400 kDa 以上であったので、DSS よりも大腸炎を惹起する作用が弱いと考えられ、今回の条件ではポルフィランは大腸炎を起こさなかったことは矛盾しない。また、2% DSS と 2% NEP を混合し投与した群は 2% DSS 投与群よりも DAI スコアの有意な増加が認められ (Fig. 3-9)、NEP が DSS によって惹起した潰瘍性大腸炎の進行を促進する可能性が示唆された。この結果についての考察は、今回のデータからは困難だが、河津ら (1995) はヒト腸内構成菌である *Bacteroides vulgatus* と *B. fragilis* がポルフィランを分解・発酵することを報告している。これらの菌はマウスの腸内にも存在する (細野, 2013) 嫌気性菌で、特に *B. vulgatus* は潰瘍性大腸炎を引き起こす原因菌ではないかとの報告がされている (Matsuda *et al.*, 2000) ため、本研究で用いたポルフィランが分解を受けずに盲腸および大腸に達してこれらの菌を増殖させたことで DSS の大腸炎を惹起する作用を增強した可能性がある。

本節ではスサビノリから抽出した NEP をマウスに対して飲水投与し、ポルフィランの腸管内への

影響を確認した。ポルフィランの飲水投与は大腸炎を引き起こさなかったが、DSS によって惹起した大腸炎の進行を促進した。また、盲腸重量は増加し、血中ガラクトース濃度に変化はなかった。このことから、ポルフィランは体内へ吸収されないと判断されるが、さらに詳細な検討が必要である。

## 第4章 結論

本研究ではスサビノリ *Pyropia yezoensis* から抽出したポルフィラン含有抽出物の体内吸収について、マウスへの経口投与後の血中ガラクトース濃度の変化と飲水投与による腸管内への作用を指標として評価した。その結果、ポルフィラン経口投与後の血中ガラクトース量に変化はなかった。また、飲水投与によるポルフィランの腸管内への影響は、単独投与の場合に腸管内の炎症は見られなかったが、盲腸重量が増加した。また、デキストラン硫酸ナトリウムとの混合投与の場合に、その炎症誘導作用を促進することが確認された。以上の結果から、ポルフィランは体内へ吸収されない可能性が高いことが示唆された。

## 謝辞

本論文の研究を遂行するにあたり、多大なるご指導をいただきました小山智之准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、ご指導いただいた大島敏明教授、長坂玲子助教に感謝いたします。

また、本論文の校閲およびとりまとめにご鞭撻を受け賜りました後藤直宏教授、久田孝教授にお礼申し上げます。

最後に、食品栄養化学研究室の皆様には大変お世話になりました。心から感謝いたします。

## 参考文献

- 能登谷正浩 ベルソブックス 012 海苔という生き物 初版 成山堂書店（東京，日本）140-154 (2002).
- 一般財団法人海苔増殖振興会 HP 産地を追って 閲覧日：2019/11/13  
[https://www.nori.or.jp/information/report/report\\_002-001.html](https://www.nori.or.jp/information/report/report_002-001.html)
- 梅川逸人，辰野拓也，王姫，平山碧，服部美香，荒木利芳，海苔発酵エキスの投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響. 日水誌, **55**, 502-505. (2008).
- 中道昇，斎藤雅信，荻野浩志，海苔由来ペプチド（NOP）の血圧に対する影響，日本未病システム学会雑誌, **8** (1), 39-45 (2002).
- Cen Tao, Tatsuya Sugawara, Sayaka Maeda, Xichang Wang, Takashi Hirata, Antioxidative activities of a mycosporine-like amino acid, poprhyra-334. *Fish. Sci. (Tokyo, Jpn.)* **74**, 1166-1172 (2008).
- F. de la Coba, J. Aguilera, F. L. Figueroa, M. V. de Gálves, E. Herrera, Antioxidant activity of mycosporine-like acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.*, **21**, 161-169 (2009).
- Kathrin Becker, Anja Hartman, Markus Ganzera, Dietmar Fuchs, Johanna M. Gostner, Immunomodulatory effects of the mycosporine-like amino acids shinorine and porphyran-334. *Mar. Drugs*. **14**, 119-130 (2016).
- Kenji Ishihara, Chiaki Oyamada, Yoko Sato, Toshiyuki Suzuki, Masaki Kaneniwa, Hiromi Kunitake, Tohihiko Muraoka, Prebiotic effect of glycerol galactoside isolated from color-faded nori in rats. *Fish Sci.* **76**, 1015-1021 (2010).
- J. R. Nunn and M. M. Holdt, Red-seaweed polysaccharides. Part II. *Porphyra capensis* and the separation of D- and L-galactose by crystallization. *J. Chem. Soc.*, **0**, 1094-1097 (1957).
- Su, J. and Hassjd, W. D., Carbohydrates and nucleotides in the red alga *Porphyra perforate* I. Isolation and identification of carbohydrates. *Bio. chemistry.*, **1** (3), 468-474 (1962).
- Peat, S., Turvey, J. R. and Rees, D. A., Carbohydrates of the red Alga, *Porphyra umbilicalis*. *J. Chem. Soc.*, **0**, 1590-1595 (1961).



- Anderson, N. S. and Rees, D. A. Porphyran: A polysaccharides with a masked repeating structure. *J. Chem. Soc.*, 5880-5887. (1965)
- Lora M. Morrice, Maitland W. Mclean, William F. Long and Frank B. Williamson, Porphyran primary structure: An Investigation using  $\beta$ -agarase I from *Pseudomonas atlantica* and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **133**, 673-684 (1983).
- 荒木繁, 大房剛, 斎藤宗勝, 桜井武麿, Porphyran 中の 3,6 anhydro-galactose 含量と乾海苔の品質. *Bull. Jap. Soc. Phycol.* **25**, 19-23 (1977).
- 濱洋一郎, 常田尚正, 杉本良子, 中川浩毅, 乾海苔に含まれる多糖含量とポルフィランの性質. *日水誌*, **77** (5), 881-886 (2011).
- Yuki Kitano, Koki Murazumi, Jingjing Duan, Kousuke Kurose, Shunichi Kobayashi, Tatsuya Sugawara and Takashi Hirata, Effect of dietary porphyran from the red alga, *Porphyra yezoensis* on glucose metabolism in diabetic KK-Ay mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **58**, 14-19 (2012).
- Keisuke Tsuge, Masaaki Okabe, Takashi Yoshimura, Toshihisa Sumi, Hirofumi Tachibana and Koji Yamada, Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of sprague-dawley rats. *Food. Sci. Technol. Res.*, **10** (2), 147-151 (2004).
- Jin Cao, Shicheng Wang, Chenwei Yao, Zi Xu, Ximing Xu, Hypolipidemic effect of porphyran extracted from *Pyropia yezoensis* in ICR mice with high fatty acid. *J. Appl. Phycol.*, **28**, 1315-1322 (2016).
- Nao Inoue, Naomi Yamano, Kotaro Sakata, Koji Nagao, Yoichiro Hama, Teruyoshi Yanagita, The sulfated polysaccharide porphyran Reduces apolipoprotein B100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (2), 447-449 (2009).
- 北島英樹, 古水雄志, 市原英明, 後藤浩一, 土井孝史, 稲野達郎, 上岡龍一, 乾燥海苔抽出物の免疫賦活効果に関する研究. *化学工学論文集*, **39** (4), 359-362 (2013).
- Hiroyuki Noda, Hideomi Amano, Koichi Arashima, Shinziro Hashimoto, Kazutoshi Nishizawa, Studies on the antitumor activity of marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55** (7), 1259-1264 (1989).
- 大住幸寛, 川合正允, 天野秀臣, 野田宏行, ポルフィラン由来オリゴ糖の消化・発酵性とマウスの血清コレステロール低下作用. *日水誌*, **64** (1), 98-104 (1998).

- 河津大輔, 田中みさ子, 藤井建夫, スサビノリ多糖類の腸内フローラに及ぼす影響. 日水誌, **61** (1), 59-69 (1995).
- 大塚博之, 前田浩, 山下昭, 経口投与による抗腫瘍ペプチドマンナン KS-2 の腸管系吸収. 癌と化学療法, **8** (10), 1570-1576 (1981).
- Masumi H. Sakurai, Tukasa Matsumoto, Hiroaki Kiyohara, Haruki Yamada, Detection and tissue distribution of anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* by polyclonal antibody. *Planta Med.*, **62**, 341-346 (1996).
- 木村伊佐美, 永濱忍, 川崎真規, 神谷明美, 片岡美紀子, ラットにおけるデキストラン硫酸誘発潰瘍性大腸炎モデルに関する基礎的研究 (第 2 報) —薬物の治療効果評価方法に関する検討—. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **105**, 145-152 (1995).
- Yoshio Araki, Tadao Bamba, Ken-ichi Mukaisho, Osamu Kanauchi, Hiromitsu Ban, Shigeki Bamba, Akira Andoh, Yoshihide Fujiyama, Takanori Hattori, Hiroyuki Sugihara, Dextran sulfate sodium administered orally is depolymerized in the stomach and induces cell cycle arrest plus apoptosis in the colon in early mouse colitis. *Oncology reports.*, **28**, 1597-1605 (2012).
- J. Watt, R. Marcus, Carrageenan-induced ulceration of the large intestine in the guinea pig. *Gut* **12**, 164-171 (1971).
- Kit-Yin Ling, Deepak Bhalla, Daniel Hollander, Mechanisms of carrageenan injury of IEC18 small intestinal epithelial cell monolayers. *Gastroenterology* **95**, 1487-1495 (1988).
- Lei Xu, Zhong-lin, Yang, Ping Li, Yong-qiang Zhou, Modulating effect of Hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Phytomedicine* **16**, 989-995 (2009).
- Takukyu Sha, Keiko Igaki, Masashi Yamasaki, Takeshi Watanabe, Noboru Tsuchmori, Establishment and validation of a new semi-chronic dextran sulfate sodium-induced model of colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.*, **15**, 23-29 (2013).
- Kenji Ishihara, Chiaki Oyamada, Ryoji Matsushima, Masakazu Murata, Toshihiko Muraoka, Inhibitory effect of pophyran, prepared from dried “nori”, on contact hypersensitivity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** (10), 1824-1830 (2005).

円谷陽一, 小竹敬久, 総説: 植物のプロテオグリカン, アラビノガラクトタン-プロテインの構造と機能. 生化学, 89 (4), 498-507 (2017).

細野朗, 総説: バクテロイデスと免疫, 腸内細菌学雑誌, 27, 203-209 (2013).

Shuji Kitajima, Shigenobu Takuma, Masatoshi Morimoto, Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp. Anim.* **49** (1), 9-15 (2000).

H Matsuda, Y Fujiyama, A Andoh, T Ushijima, T Kajinami, T Kajinami, T Bamaba, Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**, 61-68 (2000).