



オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) 由来フコイダンの胃粘膜に対する生理作用に関する研究

柴田, 英之

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2000-09-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2449

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002449>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【294】

氏 名・(本 籍) 柴田 英之 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 博ろ第47号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成12年9月22日

【学位論文題目】

オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA)由来フコイダンの
胃粘膜に対する生理作用に関する研究)

審 査 委 員

主査 教授 団野 源一

教授 北川 浩 教授 王子 善清

<要旨>

胃炎や胃潰瘍に代表される胃病変は、日本を始め欧米でも多く見られる疾患で、ストレス社会といわれる今日、国内の患者数は十二指腸潰瘍を含めて100万人にのぼると推定される。また、臨床的に Non-Ulcer Dyspepsia と呼ばれる不定愁訴患者も含めると、胃病変患者の数は相当数に上ると予想される。症状が進行した場合、胃酸分泌抑制剤や粘膜保護剤などで治療が施されるが、治癒後高い確率で病変が再発する点が問題となっている。さらに最近では、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が、胃潰瘍はもとより胃癌の要因となっているとの見解が多く見られるようになってきた。従って、胃粘膜病変の発症予防、もしくは *H. pylori* の感染予防は、現代社会における重要な課題と考えられる。

生体では、ムコ多糖であるムチンが胃表面上皮を被覆し粘膜を保護しており、また細菌や植物由来の天然多糖にも抗潰瘍効果が認められていることから、多糖は胃粘膜保護に対して重要な役割を果たすと考えられる。そこで、多糖含量の高い海藻に注目した。コンブ、ワカメをはじめとする褐藻類に含まれる天然多糖として、アルギン酸がよく知られているが、その他の多糖成分としてフコイダンが挙げられる。フコイダンはフコースを主構成糖とする多糖の総称で、特にヒバマタ (*Fucus vesiculosus*、非食用海藻) 由来のフコイダンは構造や生理作用についての解析が進んでいる。しかし、フコイダンの胃粘膜に対する作用については報告例がない。

食用褐藻類の成分多糖を分析した報告によると、各成分多糖含量は褐藻の種類により大きく異なることが示されている。この中で、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA) はフコイダン以外の成分多糖の含量が極めて少ないものとして挙げられている。オキナワモズクのこうした特長は、フコイダンを分離、精製する上で極めて有利であり、工業的生産にも対応しうるものと考えられた。以上の背景から、本研究では、食用海藻であるオキナワモズクのフコイダンを分離し、構造決定した後胃粘膜に対する作用について検討を行った。

第1章では、オキナワモズクからのフコイダンの抽出・分離条件を検討した。その結果、フコイタンは藻体の酸加熱抽出液からイオン交換法にて容易に分離することが出来た。ガスクロマトグラフィー、メチル化分析、NMR などによる構造解析の結果、本多糖はポリ (α 1-3) フコピラノースを主鎖とし、フコース残基 6 個に 1 個の割合で α 1-2 結合によるグルクロン酸側鎖を有していた。また、全フコース残基の約半分が 4-硫酸化物であった。

第2章では、オキナワモズク由来フコイダンの胃粘膜に対する作用を、ラットを用いた *in vivo* の系にて検討した。急性胃粘膜傷害モデルであるインドメタシン誘発胃粘膜傷害試験では、1 mg/rat の用量で有意な胃粘膜傷害の抑制が認められた。また、酢酸潰瘍モデルにおいて、オキナワモズク由来フコイタンは 3 mg/rat の用量で有意な潰瘍治癒促進作用を示した。本活性は、市販の最強の抗潰瘍薬である H_2 ブロッカーと同等であった。また、本活性はスミス分解フコイタンでも認められたことから、活性発現にはフコイタン主鎖が寄与しているものと推測された。インドメタシン胃粘膜傷害モデルにおいても、オキナワモズク由来フコイタンは酢酸潰瘍治癒促進と同様の効果を示した。さらに、Non-Ulcer Dyspepsia に対するモデルとして構築したエタノールによる胃粘膜傷害モデルでは、本フコイタンは市販の胃粘膜保護剤であるスクラルファートと同等の効果を示した。

第3章では、前章で明らかになったオキナワモズク由来フコイダンの胃粘膜保護作用に関与する生理活性を検討した。ウシ血清アルブミンおよびヘモグロビンを基質タンパクとして、オキナワモズク由来フコイダンの抗ペプシン作用を検討した結果、両基質に対して濃度依存的な抗ペプシン活性を示した。本活性は、他の硫酸化多糖でも認められたが、非硫酸化多糖は活性を示さなかった。ペプシンは胃粘膜傷害因子の 1 つに挙げられることから、オキナワモズク由来フコイダンの上記活性は、胃粘膜保護作用に関与していると考えられた。また、組織修復因子の一つである塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に対する本フコイダンの作用を検討した。bFGF は酸に対し不安定なペプチドで、酸性条件下で急速に失活する。このため、bFGF の酸耐性の強化は、

傷害組織の修復において非常に有効と考えられた。そこで、線維芽細胞株 3T3 の細胞増殖活性を指標に bFGF の酸安定性に対するフコイダンの作用を検討した。その結果、フコイタンは、pH 4.0 における bFGF の失活を有意に抑制した。しかし、pH 2.0 ではその作用は消失した。Basic FGF の受容体硫酸化多糖であるヘパリンは、pH 2.0 においても bFGF の活性保持作用を示したことから、オキナワモズク由来フコイダンの活性はヘパリンよりは弱いものと思われた。しかし、弱酸条件下で示された本フコイダンの作用は、潰瘍の治癒促進に一部関与するものと考えられた。

第 4 章では、*H. pylori* 感染に対するオキナワモズク由来フコイダンの作用を *in vitro* で検討した。*H. pylori* は胃炎や胃潰瘍と深く関連していると言われている細菌であることから、本菌の胃粘膜への接着阻害は、胃粘膜保護において重要な要素であると考えられる。本章では、胃ムチンおよび胃表面上皮細胞に対する *H. pylori* 接着の定量的測定系を構築し、オキナワモズク由来フコイタンを含む多糖あるいは単糖による接着阻害実験を行った。その結果、オキナワモズク由来フコイタンは両系において有効に *H. pylori* の接着を阻害した。さらに、胃表面上皮細胞上の *H. pylori* のリガンドとして報告されているルイス b 糖鎖およびスルファチドに対する *H. pylori* の接着も、本フコイタンは有効に阻害した。*H. pylori* 菌体表面タンパクに対し、オキナワモズク由来フコイタンが結合することが明らかとなったことから、本フコイタンは *H. pylori* 菌体を被覆することにより上皮細胞やムチンと本菌の接着を阻害している可能性が示唆された。

前章までで示したオキナワモズク由来フコイダンの胃粘膜保護作用および *H. pylori* 接着阻害作用は、硫酸化多糖全般に認められた。しかしその一方で、硫酸化多糖には起炎作用を示すものが多いことが知られている。起炎作用を有する物質は、新たな炎症を惹起するばかりでなく、既存の炎症や傷害を増悪させる可能性もある。そこで第 5 章では、好中球、マクロファージによる炎症性因子(腫瘍壊死因子、スーパーオキシド)の産生を指標に、フコイダンの起炎性を検討した。その結果、本フコイタンは他の硫酸化多糖と異なり起炎性を示さないことが明らかとなった。さらに、*in vivo* の

炎症モデル（ラット空気嚢炎症モデル）においても、デキストラン硫酸が激しい炎症を惹起したのに対し、オキナワモズク由来フコイタンはほとんど起炎性を示さなかった。以上のことから、オキナワモズク由来フコイタンは極めて起炎性が低く、経口摂取可能な安全性の高い天然硫酸化多糖であることが明らかとなった。

第6章では、オキナワモズク由来フコイタンを原料とした低分子性の抗潰瘍活性物質の創作を行った。その結果、部分分解フコイタンにドデシルアニリンを導入することにより、フコイタンの60倍以上の抗潰瘍活性を有する低分子性物質が調整できることが判明した。また、本誘導体は、糖鎖残基数が12前後のときに最大活性を示すことが判明した。これより、医薬品的用途に供する場合の規格化等にも、本物質は対応しうると考えられた。

以上、本研究では、オキナワモズク由来フコイタンが有効な胃粘膜保護多糖であることが明らかとなった。本多糖は分離も容易であることから、食品由来成分として利用価値が高いと考えられた。さらに、医薬品原料としての応用利用も可能であることが示唆された。

氏名	柴田 英之		
論文題目	オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i> TOKIDA) 由来フコイダンの胃粘膜に対する生理作用に関する研究		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	団 野 源 一
	副査	教授	北 川 浩
	副査	教授	王 子 善 清
要 旨			
胃炎や胃潰瘍に代表される胃病変は、ストレス社会といわれる今日多発する疾患で、国内の患者数は十二指腸潰瘍を含めて100万人にのぼると推定されている。胃病変は、胃酸分泌抑制剤や粘膜保護剤などで治療が施されるが、治癒後高い確率で病変が再発する点が問題となっている。さらに最近では、<i>Helicobacter pylori</i> (ピロリ菌) 感染が、胃潰瘍や胃癌など胃病変の要因となっていることも指摘されている。胃病変の発症予防、			

効果的な治癒、およびピロリ菌の感染予防は、今日の重要な課題となっている。本論文は、褐藻、*Cladosiphon okamuranus* TOKIDA(オキナワモズク)から抽出されたフコイダンについて、その化学構造を決定し、ラット胃粘膜傷害に対する治癒効果および胃粘膜保護効果について検討したものである。

第1章では、オキナワモズクからフコイダンを抽出・分離精製し、その化学構造を明らかにしている。本フコイダンは、ポリ(α 1-3)フコピラノースを主鎖とし、フコース残基6個に1個の割合で α 1-2結合によるグルクロン酸側鎖が存在すること、全フコース残基の半分以上が硫酸化していることを明らかにした。

第2章では、オキナワモズク由来本フコイダンの胃粘膜に対する作用を、胃粘膜傷害モデルラットを用いた系にて検討している。急性胃粘膜傷害モデルであるインドメタシン誘発胃粘膜傷害試験では、フコイダン1 mg/ratの投与で有意な胃粘膜傷害の抑制が認められた。酢酸潰瘍モデルラットでは、フコイダンは3 mg/ratの投与で有意な抗潰瘍作用を示した。本フコイダンは、市販品の中で最も作用の強い抗潰瘍薬であるH₂ブロッカーと同等の抗潰瘍作用を示した。エタノールによる胃粘膜傷害モデルラットでは、本フコイダンは市販の胃粘膜保護剤であるスク

ラルファートと同等の効果を示した。これらの抗潰瘍作用は、フコイダンの主鎖構造によることを明らかにした。

第3章では、胃粘膜傷害因子の1つに挙げられるペプシンに対するフコイダンの阻害作用を検討している。また、潰瘍の治癒促進に重要な組織修復因子の一つである塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に対する本フコイダンの作用を検討し、フコイダンが、酸性条件下で不安定なこの増殖因子の安定化に寄与することを明らかにした。

第4章では、胃炎や胃潰瘍と深く関連していると言われているピロリ菌の胃粘膜への接着を定量的に測定する系を胃の表面上皮細胞を用いて構築し、フコイダンがピロリ菌の胃の表面上皮細胞への結合を阻止することを明らかにしている。さらに、胃の表面上皮細胞のピロリ菌接合リガンドとして報告されているルイスb糖鎖およびスルファチド結合プレートへのピロリ菌の接着も、フコイダンは有効に阻害することを示し、その作用はフコイダンがピロリ菌の菌体表面に結合することにより生じることを明らかにした。

第5章では、好中球、マクロファージによる炎症性因子の産生を指標に、フコイダンの起炎性を検討した。デキストラン硫酸

ナトリウムと異なり、フコイダンは起炎性を示さないことを明らかにした。さらに、空気囊炎症モデルラットを用いたin vivo試験においても、デキストラン硫酸が激しい炎症を惹起したのに対し、オキナワモズク由来フコイダンはほとんど起炎性を示さず、オキナワモズク由来フコイダンは起炎性が低い安全性の高い硫酸化多糖であることを示した。

第6章では、オキナワモズク由来フコイダンの加水分解物を原料として低分子の抗潰瘍活性物質の調製を試みた。約12残基のフコースからなる硫酸化オリゴ糖にドデシルアニリンを導入することにより、フコイダンの10倍以上の抗潰瘍比活性を持つ物質を得ることができた。

本研究は、オキナワモズク由来フコイダンについて、その化学構造と生理機能について研究したものであり、フコイダンのもつ抗潰瘍作用、胃粘膜保護機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者柴田英之は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。