

# 博士論文の内容の要旨

## Abstract of Doctoral Dissertation

氏名 Full Name	白井 郁也 Shirai Ikuya
学位名 Name of Degree	博士 Doctor of (農学/PHILOSOPHY in AGRICULTURAL)
学位授与年月日 Date of The Degree Conferral	2024年 3月 20日/March 20th
論文題目 Dissertation Title	経口摂取した寒天由来アガロオリゴ糖の血中移行に関する研究

(博士論文の内容の要旨 Abstract of Doctoral Dissertation)

アガロオリゴ糖 (AOSs) は、寒天の構成成分であるアガロースを酸加水分解することによって得られる偶数糖である。AOSs には、抗炎症作用、抗肥満作用、抗腫瘍作用などが報告されており、有用な機能性素材として期待されている。機能性食品での有用性を評価する上では、経口摂取後の体内動態を把握する必要があるが、経口摂取した AOSs が血中に移行するかについては過去に報告されていない。そこで本研究では、機能性素材としての AOSs の有用性を立証する上で基盤となる知見を得るため、経口摂取した AOSs のラットおよびヒトでの血中移行を調べるとともに、Caco-2 細胞透過性試験を行い透過経路の解明に取り組むこととした。

本研究では、アガロビオース (2 糖、Abi)、アガロテトラオース (4 糖、Ate)、アガロヘキサオース (6 糖、Ahe) を検討対象とした。Abi、Ate、Ahe には標準品が存在しないことから、はじめに標準品の取得及び高感度での分析方法の検討を行った。寒天の酸加水分解により調製した AOSs をフラッシュカラムクロマトグラフィーによって分画した。得られた分画物については、NMR 測定および LC/MS 測定を行い、それぞれの分画物の構造が Abi、Ate、Ahe であることを確認し、以降、これらを標準品として使用した。定量分析においては、4-アミノ安息香酸エチルエステルで標識化することにより、高感度での検出が可能となった。AOSs 中の各糖含有量を測定したところ、それぞれの含有量は重量比で Abi が 30.2%、Ate が 29.1%、Ahe が 31.6%であった。In vivo 吸収試験では、Sprague-Dawley (SD) 系統の雌性ラットを使用した。本試験は、信州大学動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号 020062)。ラットを 5 匹ずつ 3 群に分け、コントロール群、AOSs 低用量群 (1 g/kg 体重)、AOSs 高用量群 (5 g/kg 体重) とした。1 週間の順化期間後、12 時間絶食させ、生理食塩水に溶解した AOSs を、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与前および投与 1、2、4、8、24 時間後に尾静脈より採血した。血漿中の AOSs を測定したところ、Abi、Ate、Ahe のいずれにおいても、投与 4 時間後をピークトップとする血漿中濃度の時間推移が確認された。また、Abi、Ate、Ahe のいずれについても、投与量依存的に血漿中濃度の曲線下面積 (AUC) は高値を示した。血漿中の各糖の AUC を比較したところ、Abi、Ate、Ahe の順に高値を示し、重合度の低い糖ほど多くの糖が血中に移行することが明らかになった。

次に、AOSs の腸管透過性を評価すべく、ヒト結腸由来 Caco-2 細胞を用いた in vitro 試験を行った。Caco-2 は 21 日間培養し、小腸上皮細胞様に分化した単層膜を使用した。その結果、Abi は Ahe と比較して透過速度が有意に高値を示し、ラットでの吸収試験と同様の結果が得られた。続いて、AOSs の透過経路を特定するため、各種阻害剤を添加し、Abi および Ahe の透過量に変化があるかを検討した。代謝阻害剤であるアジ化ナトリウムおよびトランスサイトーシス阻害であるコルヒチンを添加したところ、Abi および Ahe の透過量に有意な変化は見られなかった。このことから、Abi および Ahe の透過に能動輸送およびトランスサイトーシスは関与していない可能性が示唆された。一方で、タイトジャンクション阻害剤であるサイトカラシン B を共投与したところ、Abi および Ahe の透過量は有意に増加した。また、Abi と Ahe の透過量および細胞のバリア性の指標である経上皮電気抵抗の相関係数は、 $-0.832$  および  $-0.814$  であり、高い負の相関を示した。これらのことから、Abi および Ahe は主に細胞間隙を透過することが示唆された。

ヒトでの AOSs の血中移行を評価するため、健常な成人男女を対象としたオープン試験を実施した。本試験は東京家政大学の倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則って実施した（承認番号：R1-8）。21 歳から 30 歳までの女性ボランティア計 1312 名（男性 1 名、女性 12 名）が参加した。前日の夜から 12 時間の絶食期間を設けた後、高用量試験では AOSs 粉末 5 g、低用量試験では AOSs 粉末 2 g を 200 mL の水に溶解し、摂取した。採血は、摂取前および摂取 1、2、4 時間後に行い、血漿を使用した。高用量試験と低用量試験の間には 1 ヶ月のウォッシュアウト期間を設定した。1312 名のうち 4 名は、採血の困難等により脱落した。高用量試験の結果、Abi および Ate は血中より検出されたが、一方で Ahe は検出されなかった。低用量試験の結果、Abi は血中より検出されたが、Ate は 1 名の被験者を除いて検出されなかった。また、Ahe は高用量試験と同様に検出されなかった。以上より、ヒトにおいても経口摂取した AOSs は血中に移行すること、さらに、その移行量は重合度が低いほど高いことが示された。

本研究の結果より、経口摂取した AOSs はラットおよびヒトの血中に移行すること、さらに、重合度の低いオリゴ糖の方が多く検出されることが示された。また、AOSs の腸管透過は細胞間隙経路を介することが示唆された。AOSs の血中移行が認められたことより、AOSs の機能性は消化器官に留まらず、関節などの末梢組織での発現が期待される。