
ヒアルロン酸の経口摂取後のリンパ液・血液への移行性と腸管免疫系への関与

北海道大学大学院薬学研究院・講師 佐藤 夕紀

■ 目的

ヒアルロン酸とは、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の2糖を1単位とした酸性ムコ多糖である。低分子のヒアルロン酸オリゴ糖は $n=1-10$ 、分子量8,000Da程度までであるが、高分子のヒアルロン酸は分子量が数万から数百万Daに至るものまで存在し、類似した構造を持ちながら多様な分子量を有する化合物である。我々はこれまでに経口投与後のヒアルロン酸はより低分子の方が吸収されやすいことを明らかにしている。ただし、経口投与されたヒアルロン酸の体内での具体的な分子量の分布を明らかにすることはできていない。そこで本研究では、その比較的low分子のヒアルロン酸に焦点を当て、経口投与されたヒアルロン酸の消化管内の挙動を明らかにすることを目的とした。

■ 方法

約12時間絶食させたWistar系雄性ラット(約280-320g)にヒアルロン酸製剤(平均分子量2,000Da)を200mg/kgで経口投与し、経時的に門脈、または末梢静脈より採血後、直ちに微量のヘパリンナトリウムと混和し、遠心分離後、血漿として測定まで保存した。まず、得られたサンプルは、ヒアルロン酸測定キット等により測定した。また、サンプル前処理法としては、ブランク血漿にヒアルロン酸を添加し、タンパク質分解酵素であるアクチナーゼE、その後メタノール、クロロホルム等を用いてタンパク質を血漿中から除く処理をした。その後、陰イオン交換カラムを用いて、保持、精製を行い、溶媒を乾固、再溶解させ、HPLCでの定量を試みた。

■ 結果および考察

使用したヒアルロン酸定量キットでは、低分子量のヒアルロン酸の反応性が低下していること、また検量線の再現性の確認が難しかったことなどから、HPLCやLC/MS等を用いる前の前処理法を構築する必要があると考えられた。前処理法の検討では、アセトニトリルでの除タンパク質操作のみでは、ヒアルロン酸が共沈し、不適であることが示唆された。アクチナーゼEを用いてヒアルロン酸を遊離させた後、同様の操作を行うことで、共沈は抑制されたものの、精製は不十分であることが認められた。そこで、固相抽出カラムを用いると、血漿中に存在する夾雑物を排除可能であった。その後さらなる検討の結果、酸-塩基の存在下で、メタノール、クロロホルム抽出後、固相カラムで保持精製することで、夾雑物が少ない状態での低分子ヒアルロン酸2、4、6、8糖と考えられるピークが確認された。

■ 結語

本法により、ラット血漿中から8糖以下の低分子ヒアルロン酸を簡便に抽出することに成功した。今後は、本法により抽出、精製したヒアルロン酸を蛍光標識等で感度をさらに高める点などを中心に検討してゆく。