

高感度フコイダンELISA測定系の開発と 臨床応用について

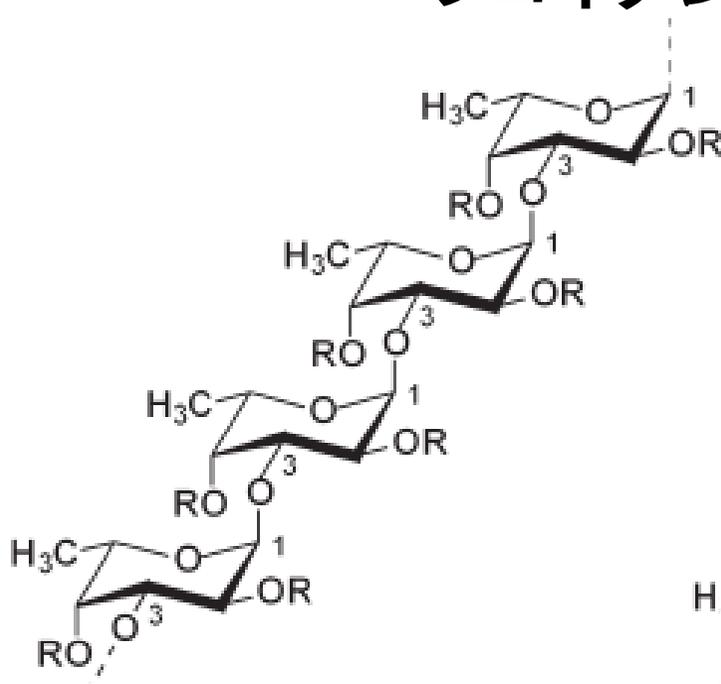
群馬大学医学部保健学科 教授
長嶺竹明

2010/11/26

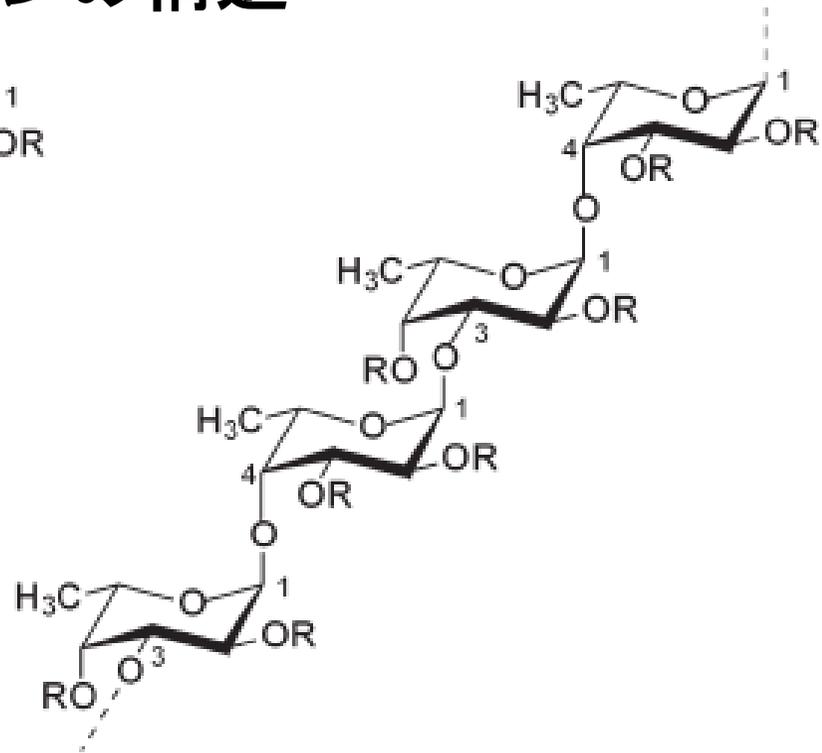
フコイダンとは

- ▶ ポリフコースの主鎖と、硫酸基、ウロン酸、少量の単糖類が側鎖として結合した物質の総称である。
- ▶ 褐藻類(コンブ、ワカメ、モズクなど)の細胞壁構成成分であるが、生物種により構造が異なる。
- ▶ 機能性飲料や健康食品、インスタント食品や餃子などの加工食品、化粧品などに幅広く使用されている。

フコイダンの構造



$\alpha(1\rightarrow3)$ 型



$\alpha(1\rightarrow3)$ と $\alpha(1\rightarrow4)$ 型

R : 硫酸基, ウロン酸 (α -D-Glucuronic acid, α -D-mannuronic acid), etc...

フコース含量 : 24.8%~58.7%、

SO₃含量 : 15.1%~34.8%

フコイダンの生理活性

培養細胞、動物実験で確認されている作用

- 抗凝固作用 (Heparin cofactor IIを介したthrombin阻害など)
- 抗腫瘍活性
 - アポトーシス誘導活性 (Caspase経路の活性化)
 - 浸潤抑制 (ラミニン結合阻害、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害)
 - 転移抑制 (セレクチン阻害)
 - 血管新生阻害 (VEGF阻害)
 - 免疫活性化 (パイエル板での腸管免疫、Mφの活性化、NK活性化)
- 抗炎症作用 (IL-10産生亢進)
- 抗ウイルス作用 (HSV、CMV、HIV、HTLV-1など)

臨床でも確認されている作用

- 抗 *Helicobacter pylori* 作用
- 抗潰瘍作用
- 機能性胃腸症による上部不定愁訴の改善

主に消化管内の効果

多岐に及ぶフコイダン生理活性の要因

☆各種フコイダンに共通する生理活性

L-セレクチンのリガンド:白血球遊走阻害

☆構造に関連する生理活性

* 硫酸基と生理活性

結合する位置:抗ウイルス作用(C4)

結合量:抗白血病作用

* 分子量と生理活性

高分子 > 低分子:抗腫瘍作用

高分子 < 低分子:抗凝固作用、抗活性酸素作用

フコイダンの消化、吸収

- ▶ 消化管やヒト体内にはフコイタンを分解する酵素や細菌がない
生理的条件下では強酸での加水分解もほとんどない

↓(巷のうわさ)

- ▶ フコイタンのような高分子多糖は腸管から吸収されない
低分子フコイタンだから吸収される

↓しかし

- ▶ 高分子フコイタンの経口摂取実験

DEN誘導性肝硬変ラットにおける抗線維化作用 (Nakazato et al, J Gastroenterol Hepatol 2010)

ヒト末梢血中の造血幹細胞の動員とCXCR4発現亢進 (Irhimeh et al, Exp Hematol. 2007)

↓仮説

- ▶ 高分子フコイタンは腸管上皮で吸収される

↓

フコイタン特異的抗体を作製し、血中・尿中フコイタンの高感度定量法を確立する

これまでのフコイダン抗体およびフコイダン定量法

- ▶ *Laminaria japonica* Areschoug (和名:メコンブ) のフコイダン特異的抗体の作製及び競合的ELISAによるメコンブ中フコイダンの定量及び tissue printing による分布解析 (Mizuno M. *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* 2009)
- ▶ Chondroitin sulfate C 抗体のフコイダンへの交差反応性を利用した競合ELISAによるフコイダン定量およびフコイダン負荷試験での血中濃度の定量的試み (Irhimeh MR. *et al. Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2005)
- ▶ オキナワモズクフコイダンのカルボキシル基への蛍光物質 (DMEQ-hydrazide) のプレラベルによる蛍光HPLC定量法 (高木ら、*Chromatography.* 2001)



それぞれフコイダンへの特異性、測定感度、ヒト生体試料測定の際の難あり

Cladosiphon okamuranus Tokida

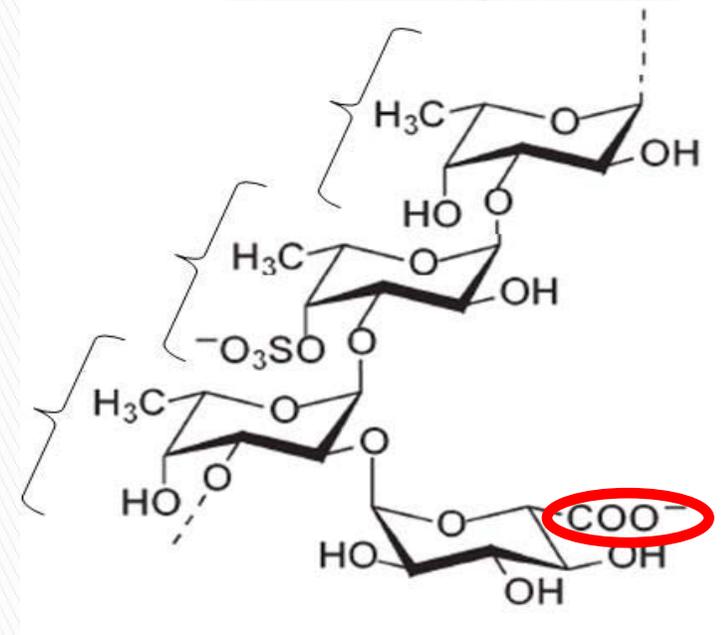
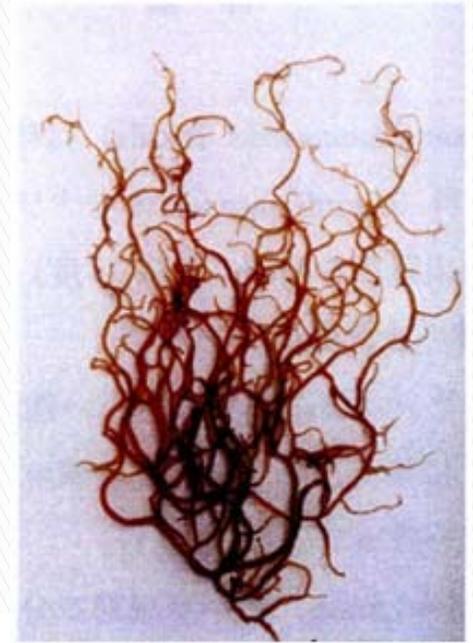
和名: オキナワモズク

特徴

フコース主鎖のフコースの約半分の4位に硫酸基をもつ。他のフコイダンに比べて、ウロン酸 (特にグルクロン酸)が多い。



グルクロン酸のカルボキシル基にカルボジイミド反応でキャリアタンパク質 (KLH) を結合させることで抗原にする。



抗体の作製

- ① KLH結合オキナワモズクフコイダンとアジュバンドとしてFCAを加えてウサギに免疫



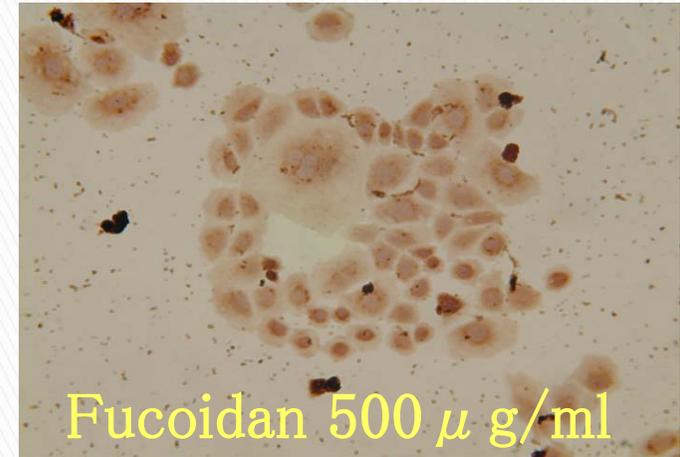
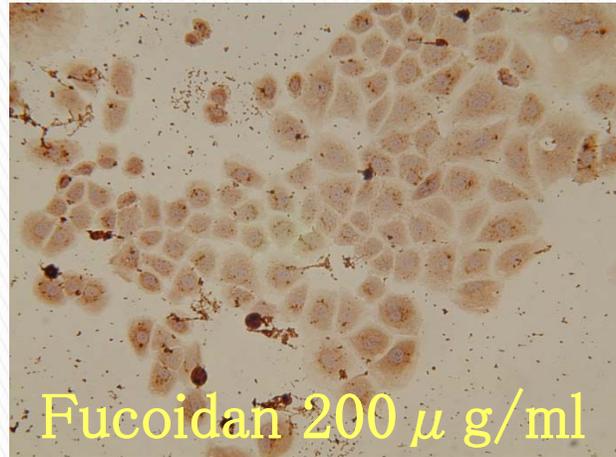
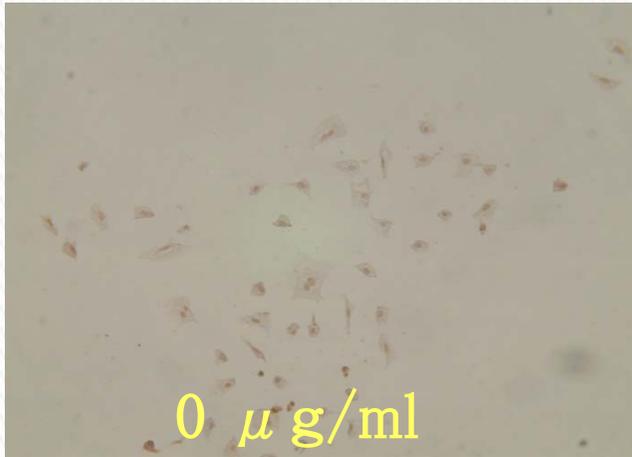
- ② 抗血清をオキナワモズクフコイダン結合アフィニティーカラム* でアフィニティー精製

* オキナワモズクフコイダン結合アフィニティーカラム

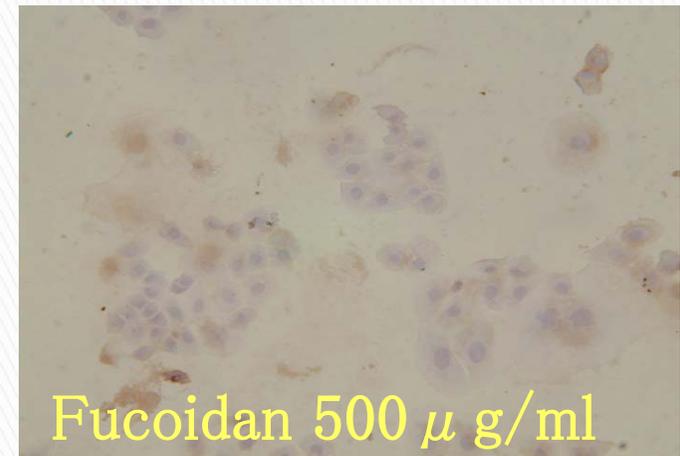
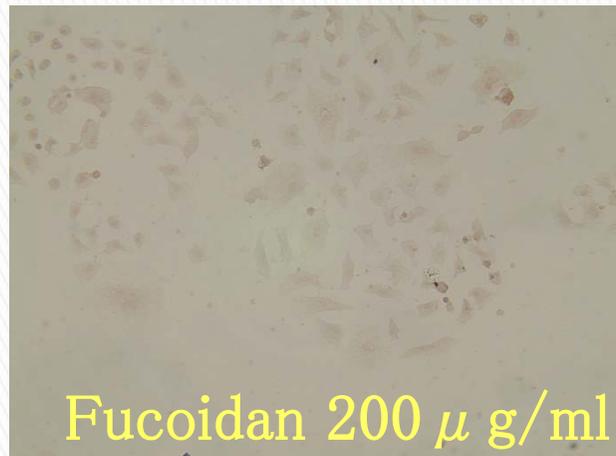
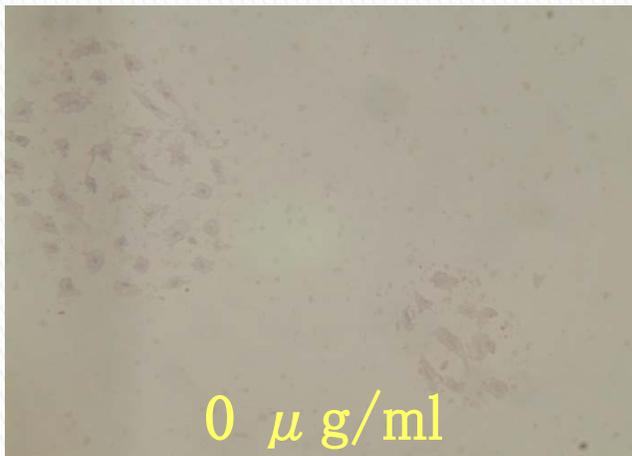
EAH sepharose 4B (樹脂表面にアミノ基を持つ樹脂)にカルボジイミド反応(EDC)でオキナワモズクフコイダンを固相化した。
これに抗血清を通し、3 M MgCl₂ で溶出する。

Fucoidan antibody absorption test in TRL1215 cells

Fucoidan immuno histochemistry : before fucoidan antibody absorption



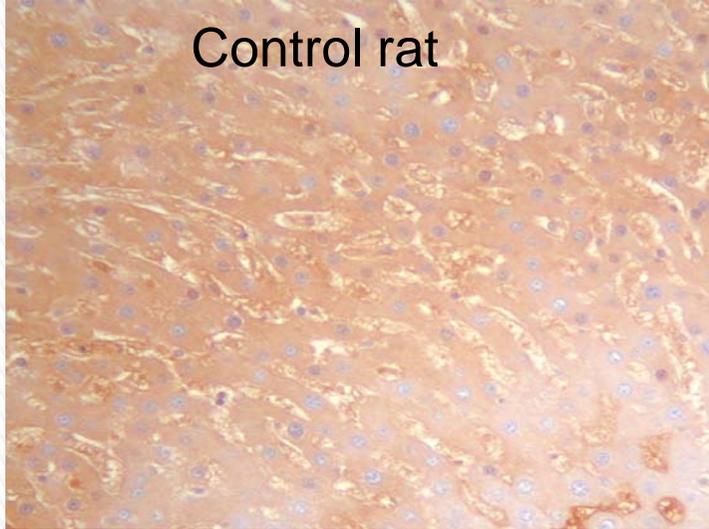
Fucoidan immuno histochemistry : after fucoidan antibody absorption



Fucoidan immuno histochemistry

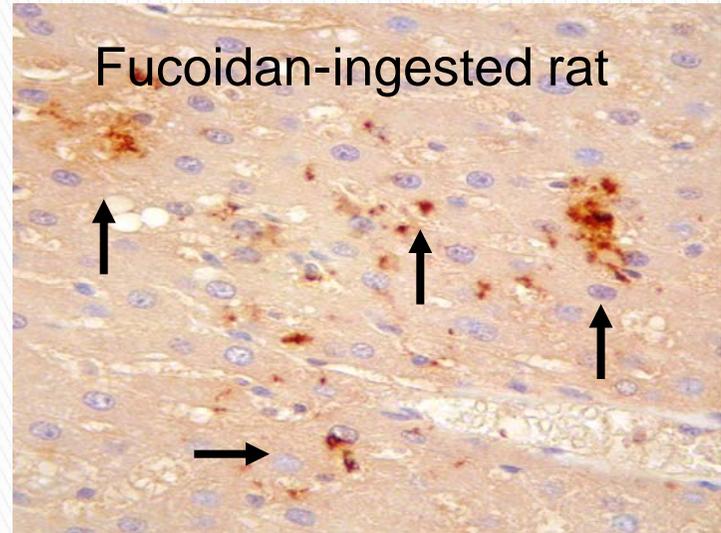
Liver

Control rat



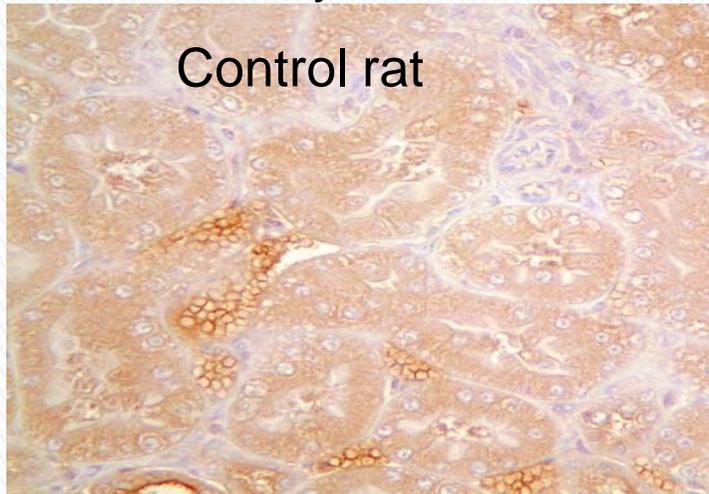
Liver

Fucoidan-ingested rat



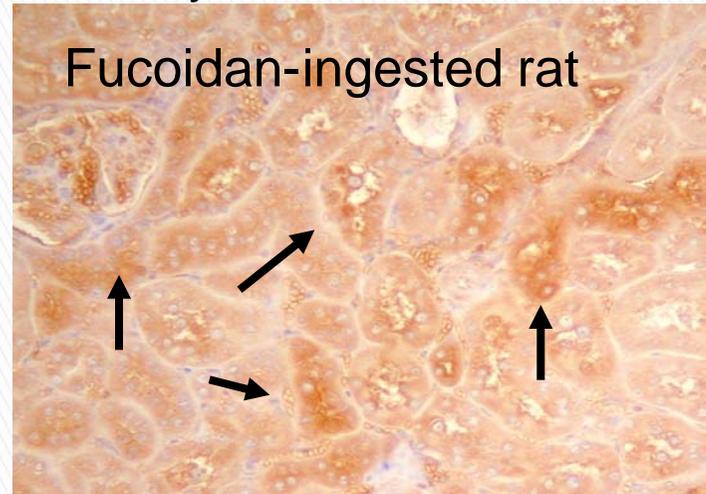
Kidney

Control rat

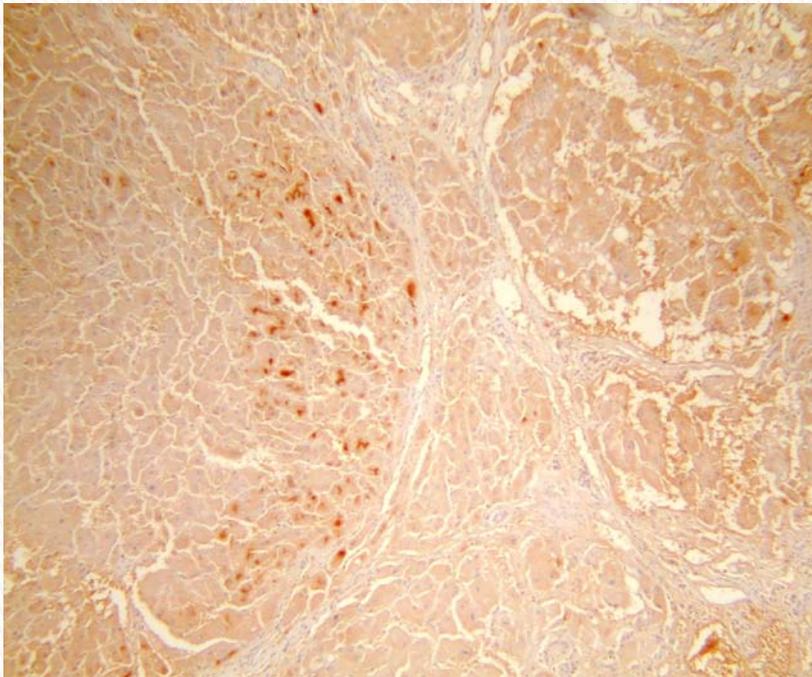


Kidney

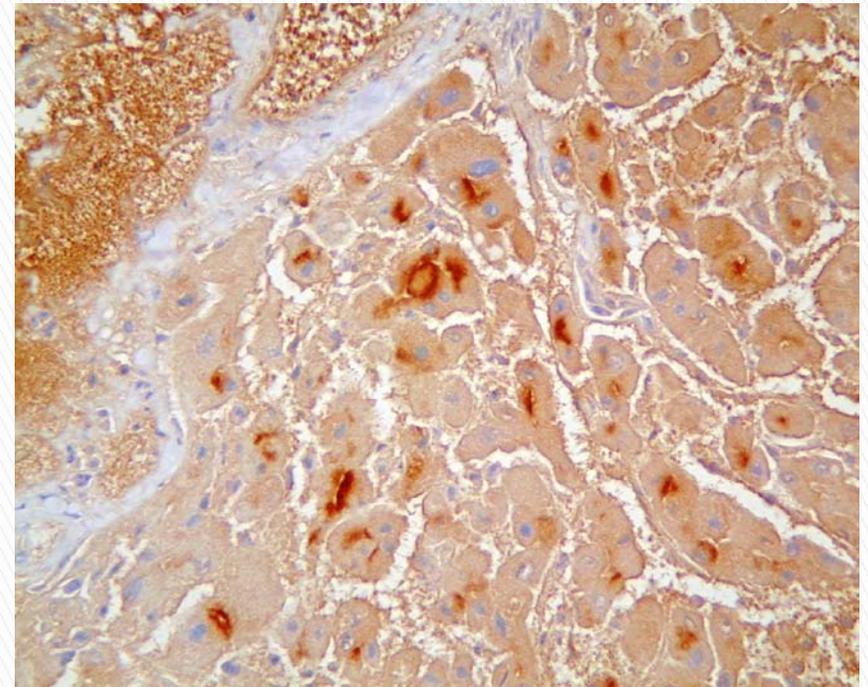
Fucoidan-ingested rat



Fucoidan immuno histochemistry in DEN-induced liver fibrosis rat

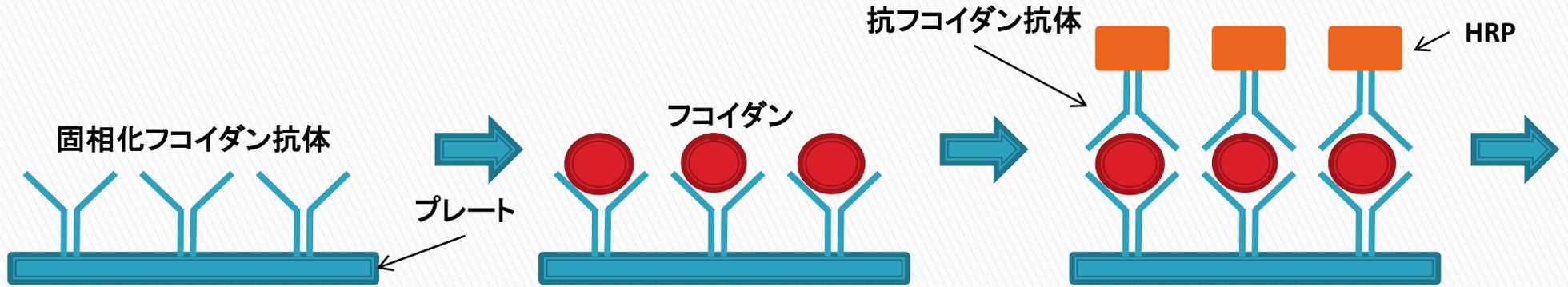


× 200



× 400

フコイダンELISA定量法の流れ

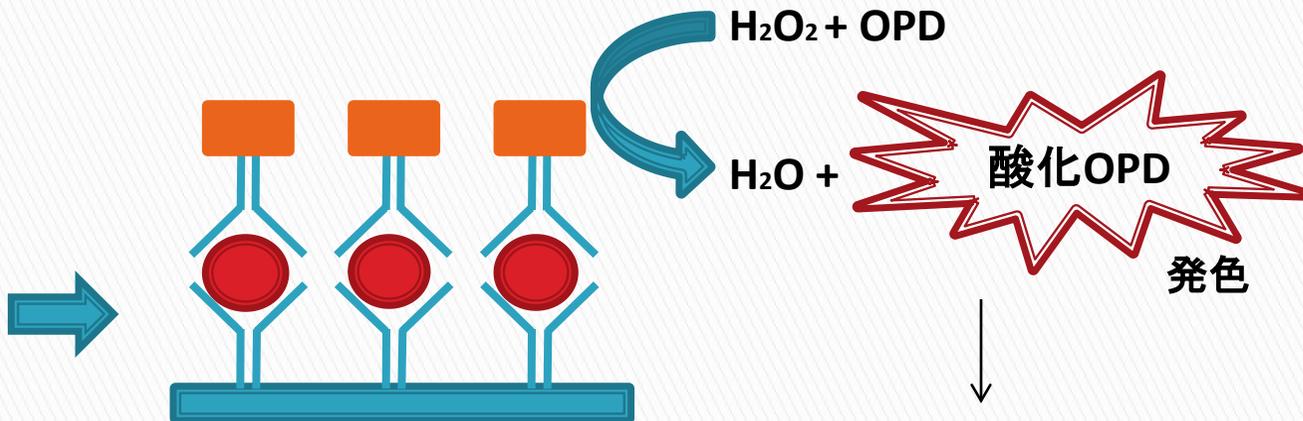


1. プレートへの抗フコイダン抗体の固相化

2. 抗原(フコイダン)の固相化抗体への結合

3. HRP標識抗フコイダン抗体の結合

HRP: HorseRadish Peroxidase

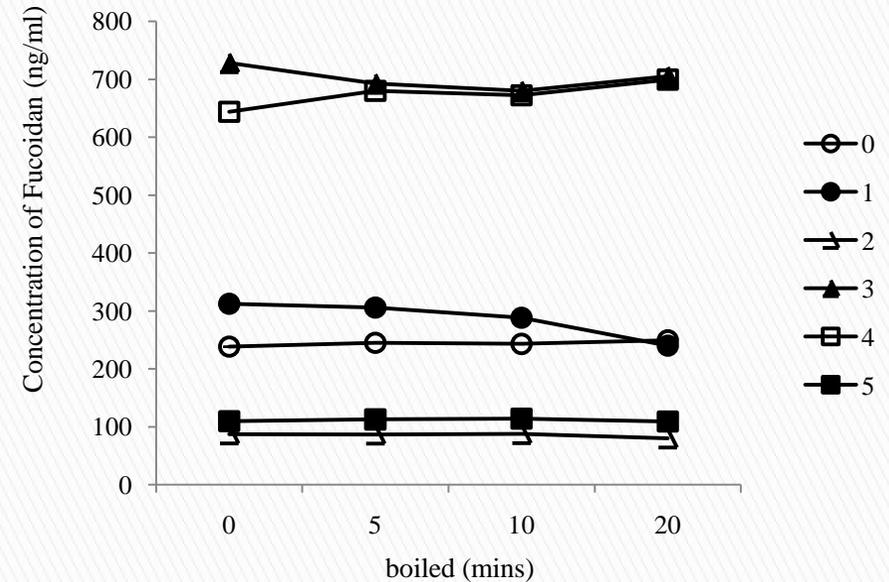
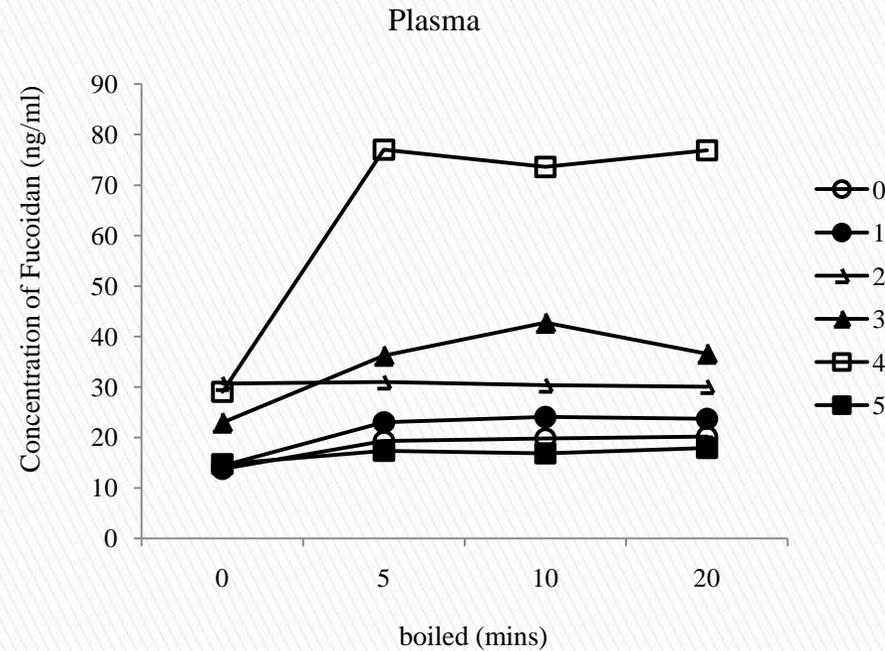
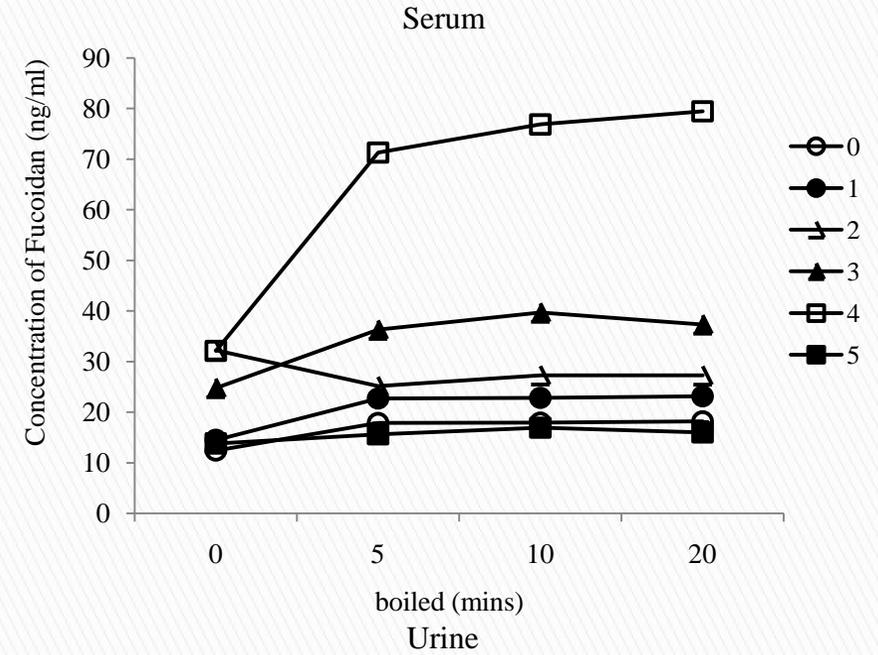
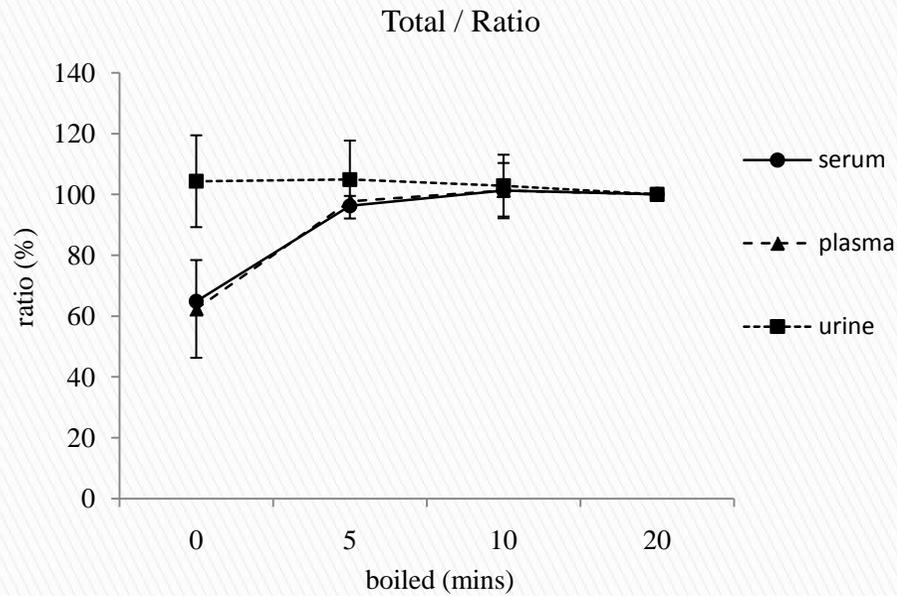


4. HRPによるOPDの発色

5. マイクロプレートリーダーによりOD 492nmを測定

OPD: *o*-phenylene diamine

Pretreatment of specimens on the ELISA method for fucoidan

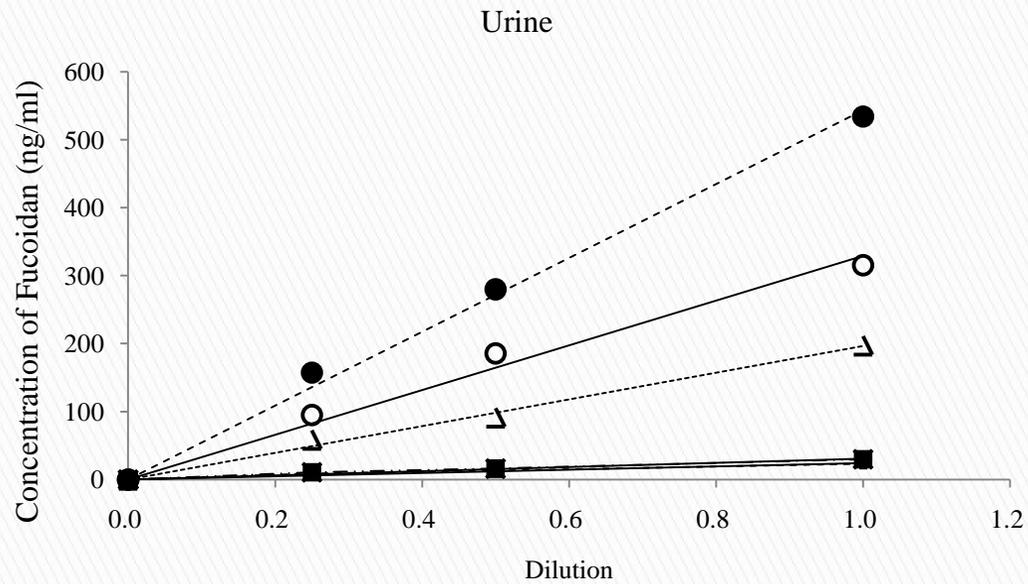
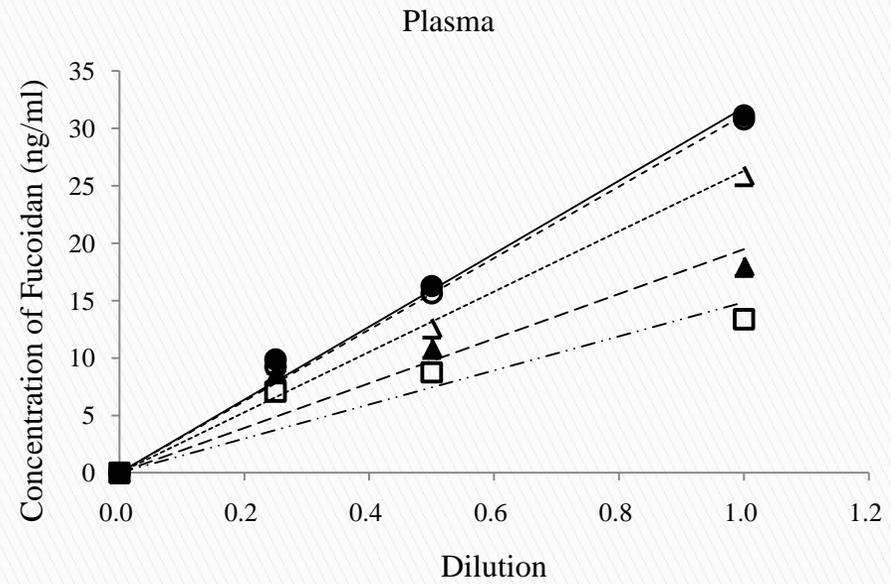
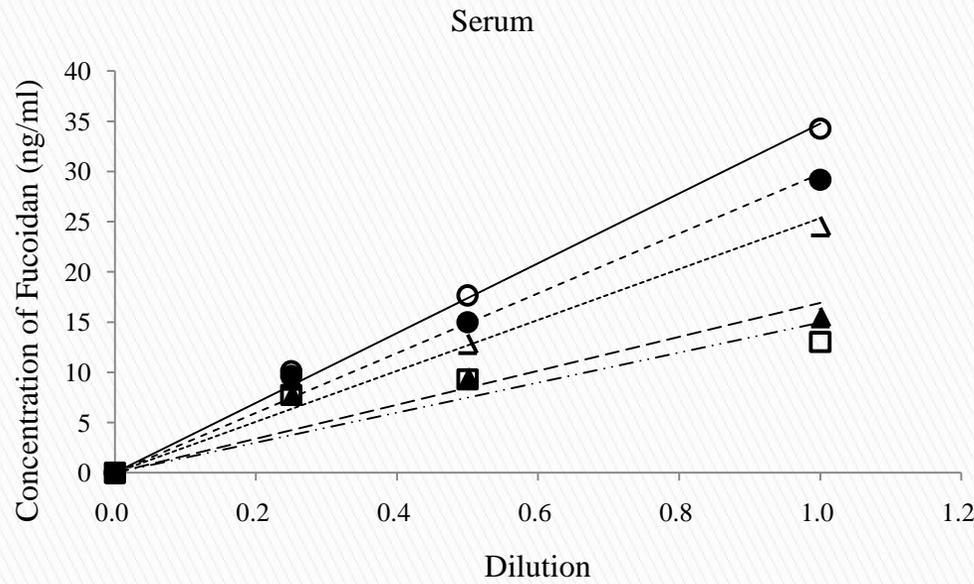


Recovery of Fucoidan Added in Specimens

	Concentration (ng/ml)	Recovery (%)
Serum		
H (80 ng/ml)	84.3 ± 3.7	105 ± 4.6
M (50 ng/ml)	53.1 ± 3.0	106 ± 6.0
L (20 ng/ml)	19.5 ± 1.7	97 ± 8.5
Plasma		
H (80 ng/ml)	90.3 ± 1.3	113 ± 1.6
M (50 ng/ml)	42.8 ± 0.6	86 ± 1.2
L (20 ng/ml)	21.4 ± 3.1	107 ± 15.4
Urine		
H (80 ng/ml)	77.7 ± 11.1	97 ± 13.9
M (50 ng/ml)	49.2 ± 5.2	98 ± 10.3
L (20 ng/ml)	19.7 ± 1.7	98 ± 8.7

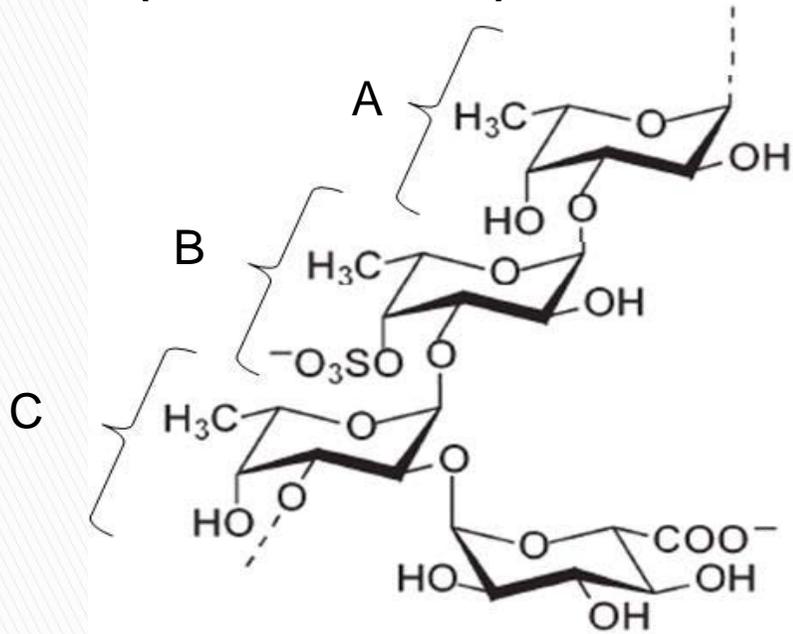
Fucoidan concentrations in each normal pool sample were not detected.

Dilution Curve of Fucooidan in the Serum, Plasma and Urine

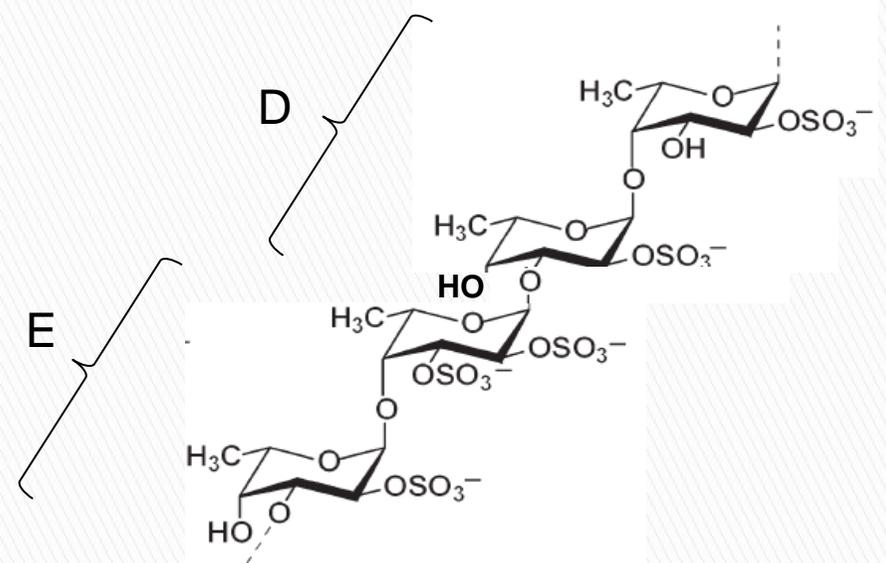


Structure of Fucooidan and Other Polysaccharides

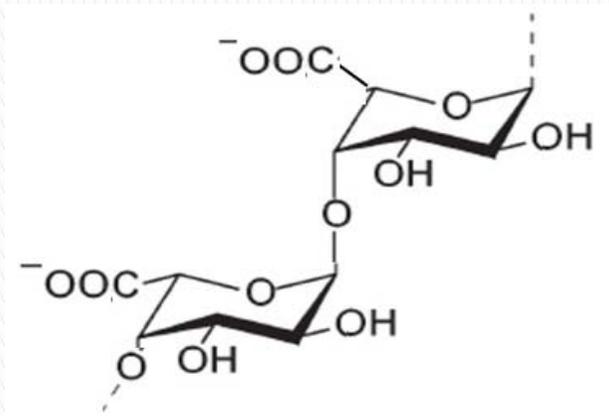
a) Fucooidan (*C. okamuranus*)



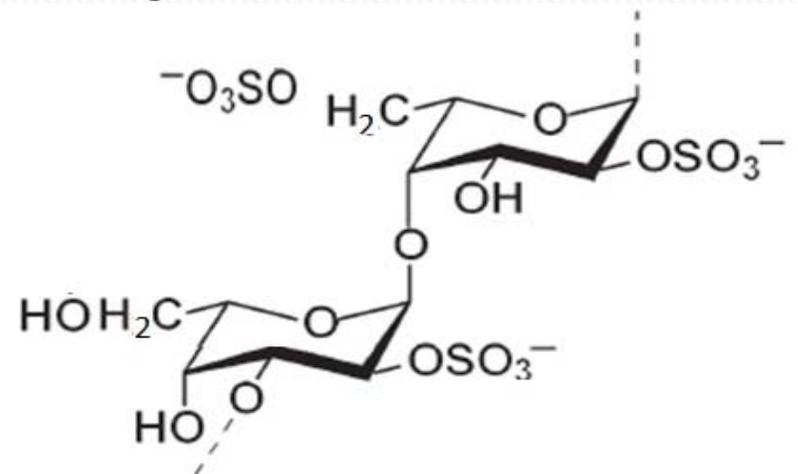
b) Fucooidan (*F. vesiculosus*)



c) Alginic Acid



d) Carrageenan

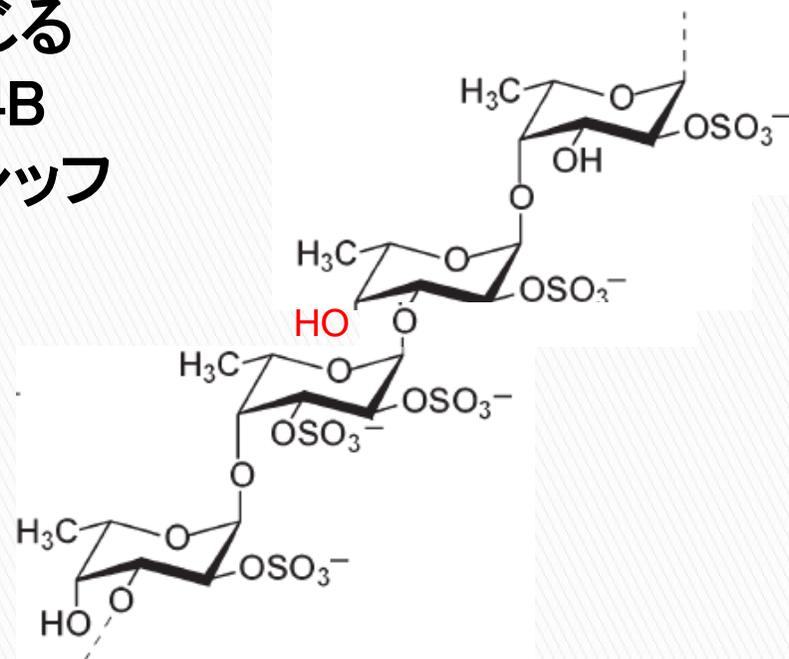


Fucus vesiculosus フコイダン (Sigma Fucoidan) による二重精製

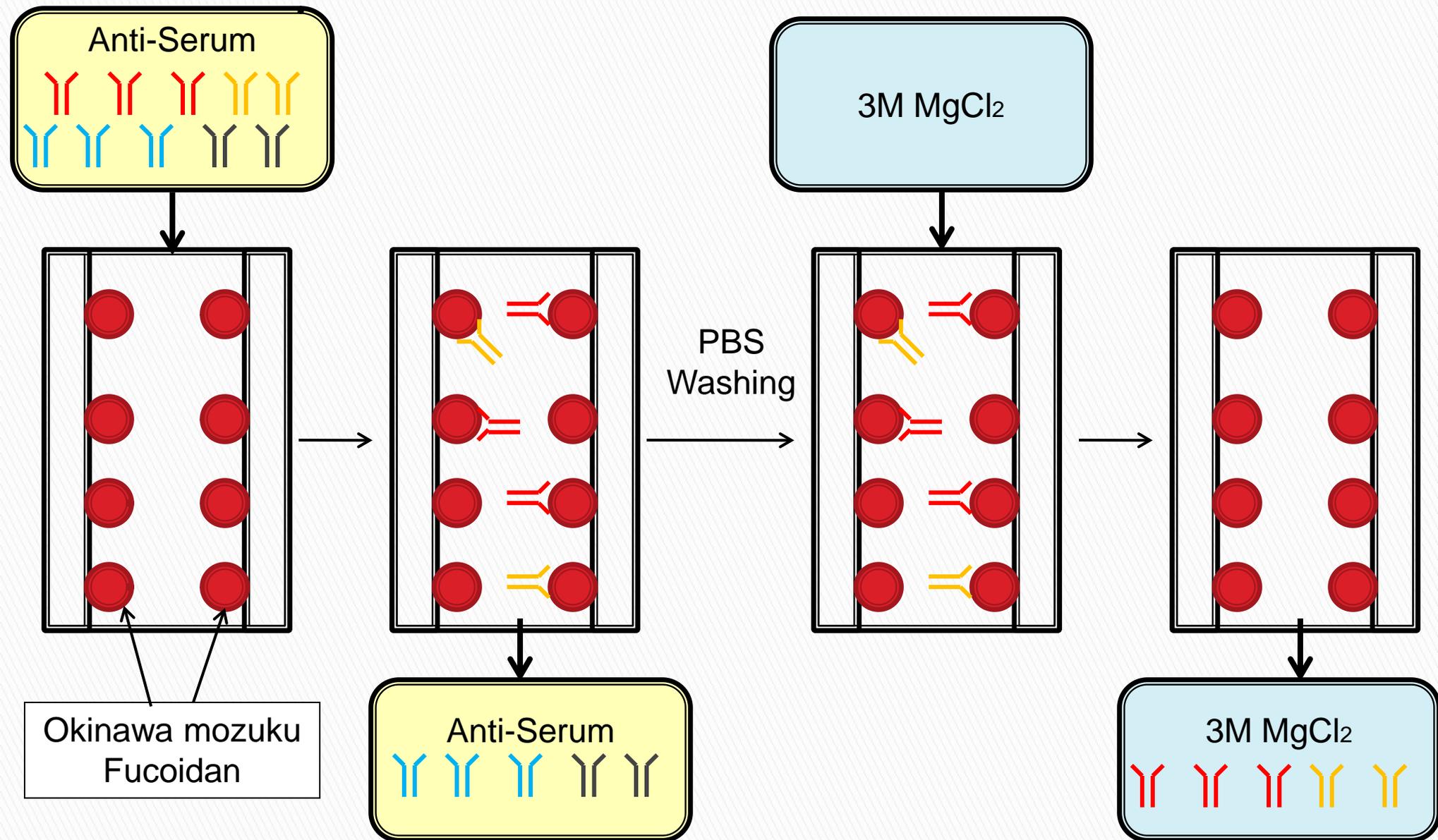
- オキナワモズクフコイダン固相化カラムで精製した抗体を、Sigmaフコイダン固相化アフィニティーカラム*で精製。

* Sigmaフコイダン固相化アフィニティーカラム

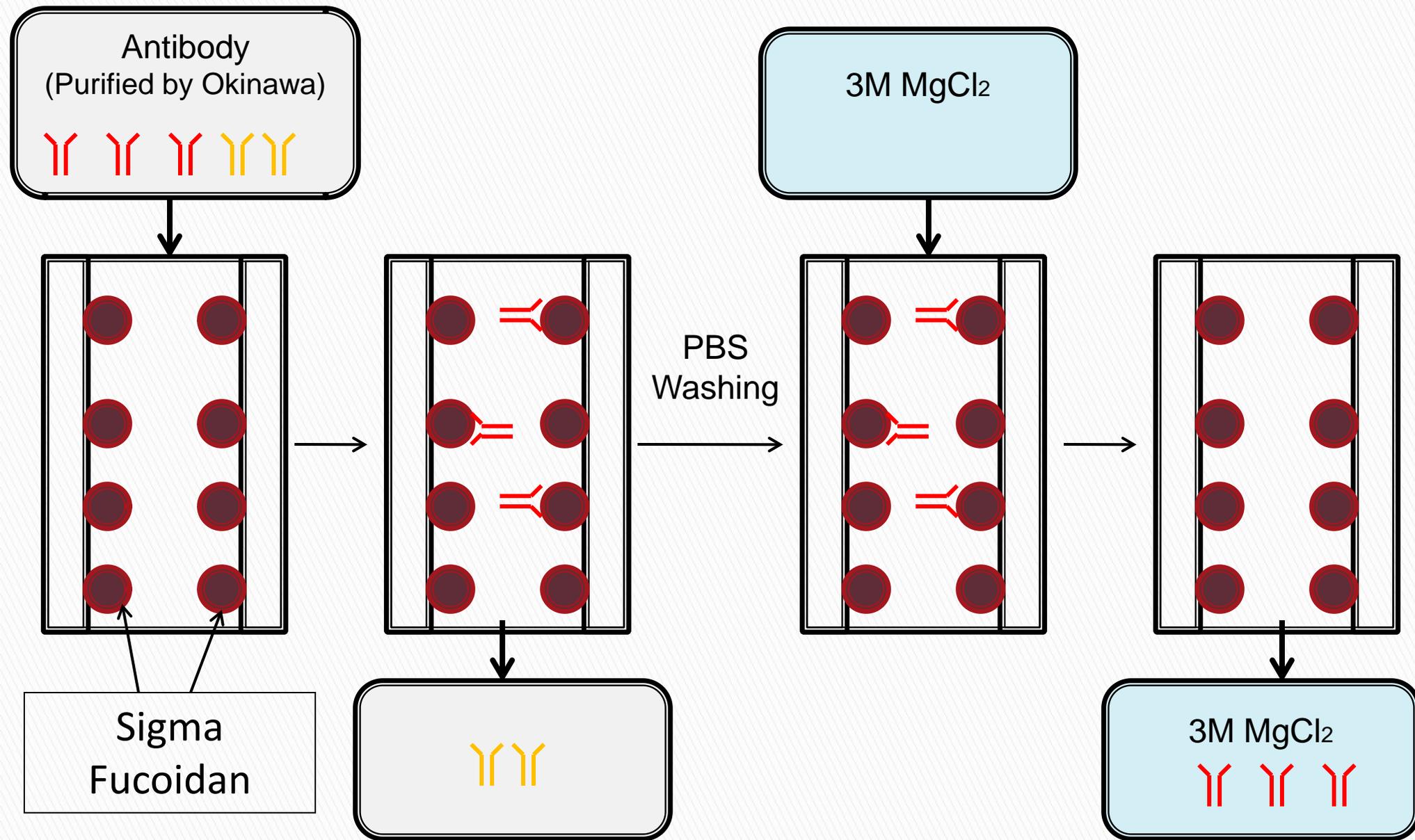
Sigmaフコイダンを過ヨウ素酸酸化して生じるアルデヒド基と、CNBr-activated sepharose 4Bに固相化した正常ウサギIgGのアミノ基とでシッフ塩基を形成させて架橋。



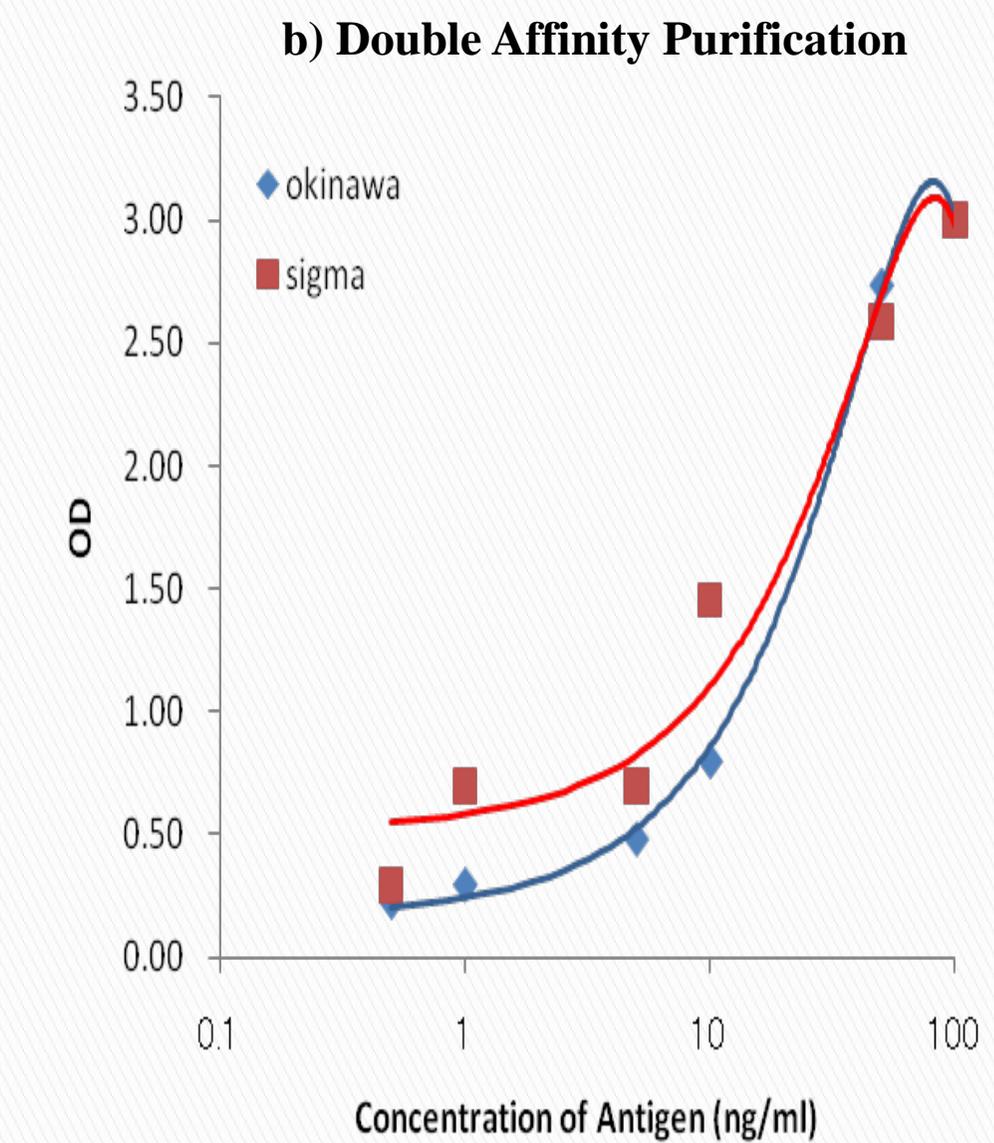
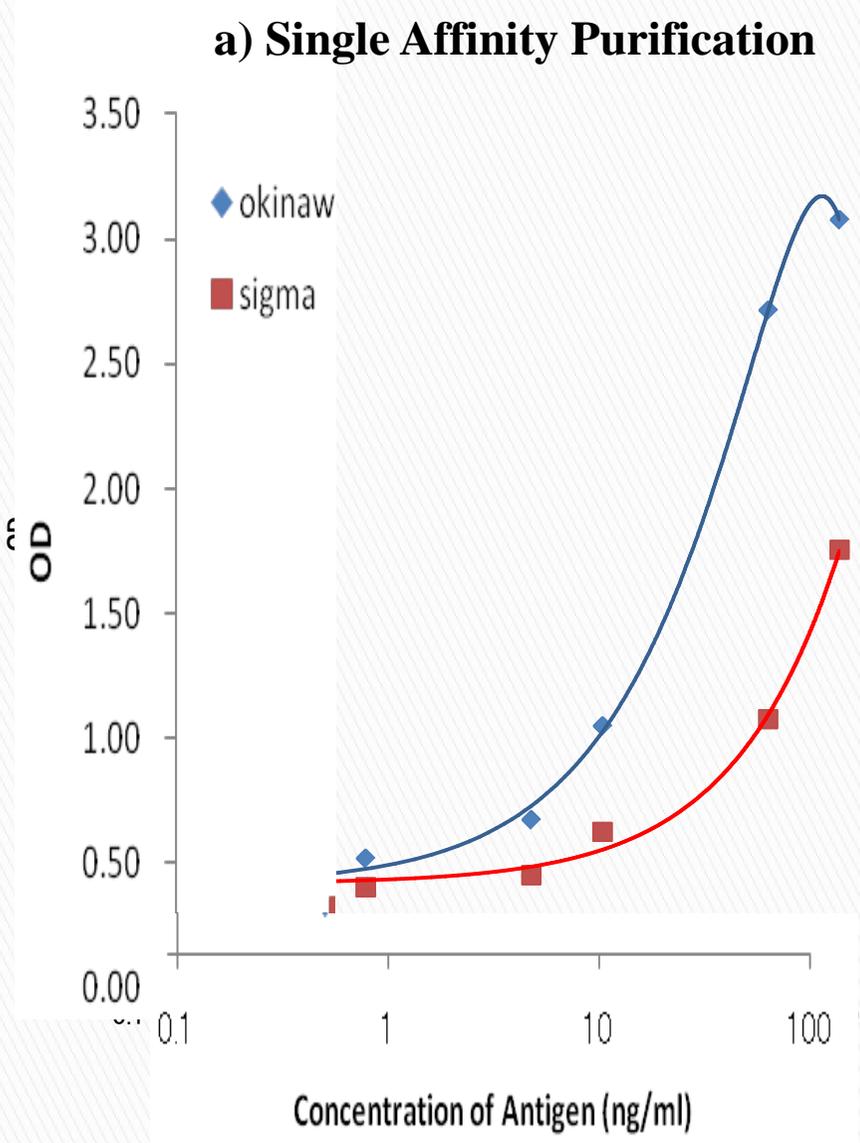
Antibody Purification using Okinawa Mozuku Fucoïdan-Immobilized Affinity Column from The Anti-Serum Against Okinawa Mozuku Fucoïdan Conjugated by KLH



Antibody Purification using Sigma Fucoidan-Immobilized Affinity Column from The Antibody Against Okinawa Fucoidan Affinity Purification

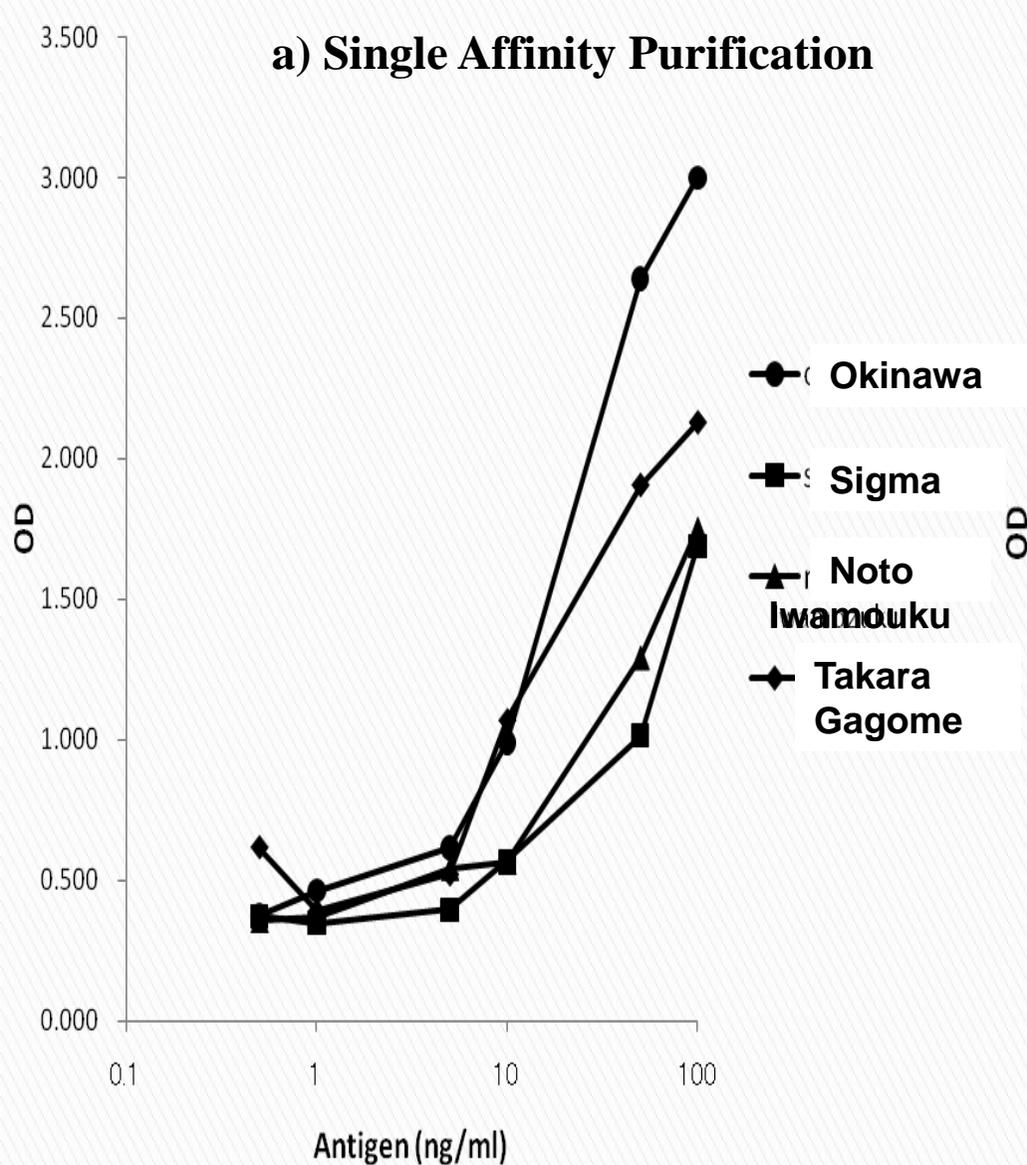


Reactivity of sigma fucoidan specific antibody isolated using sigma fucoidan-affinity column from the antibody against Okinawa fucoidan

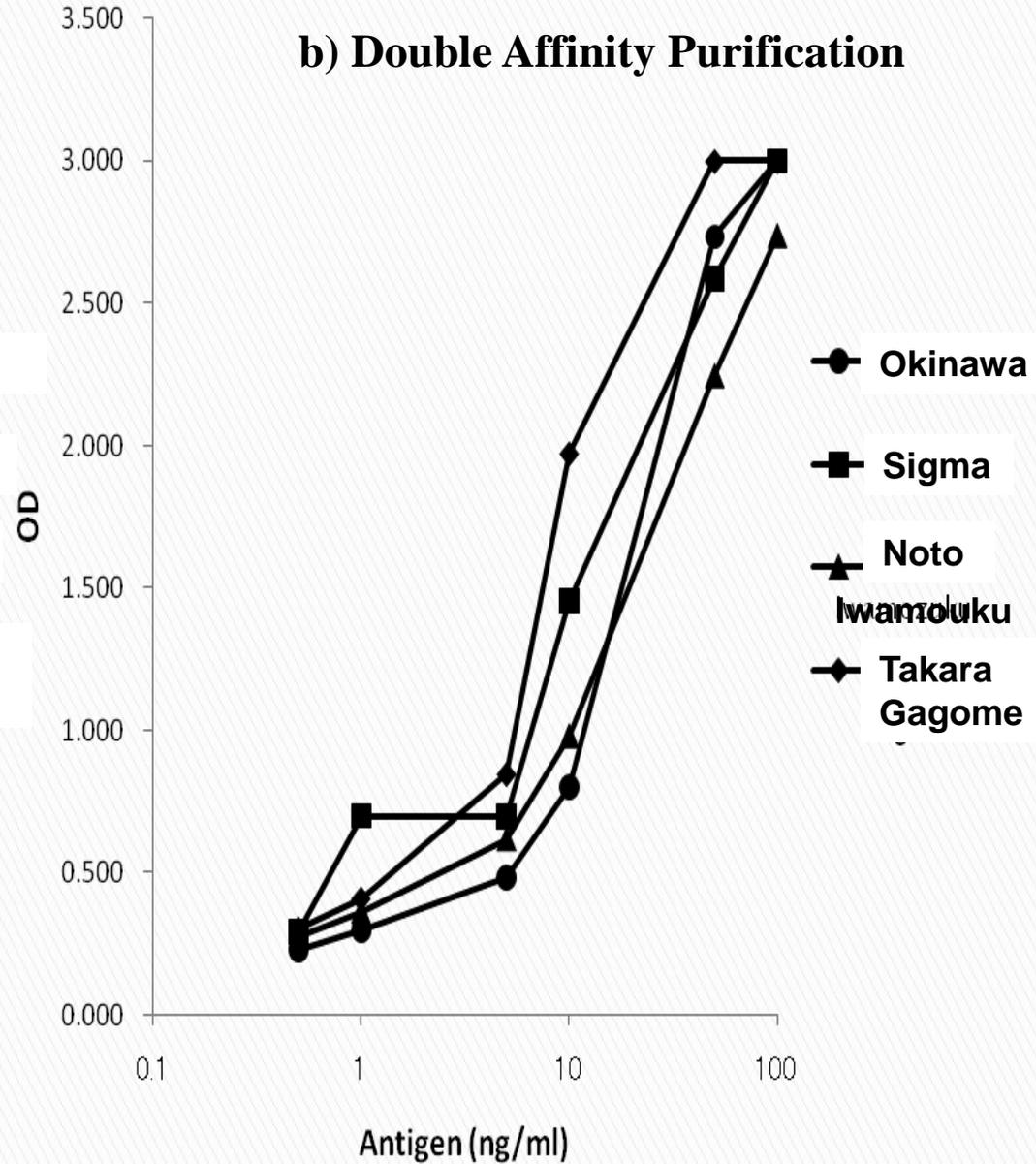


Reactivity of Sigma fucoidan Specific Antibody in Other Fucoidans

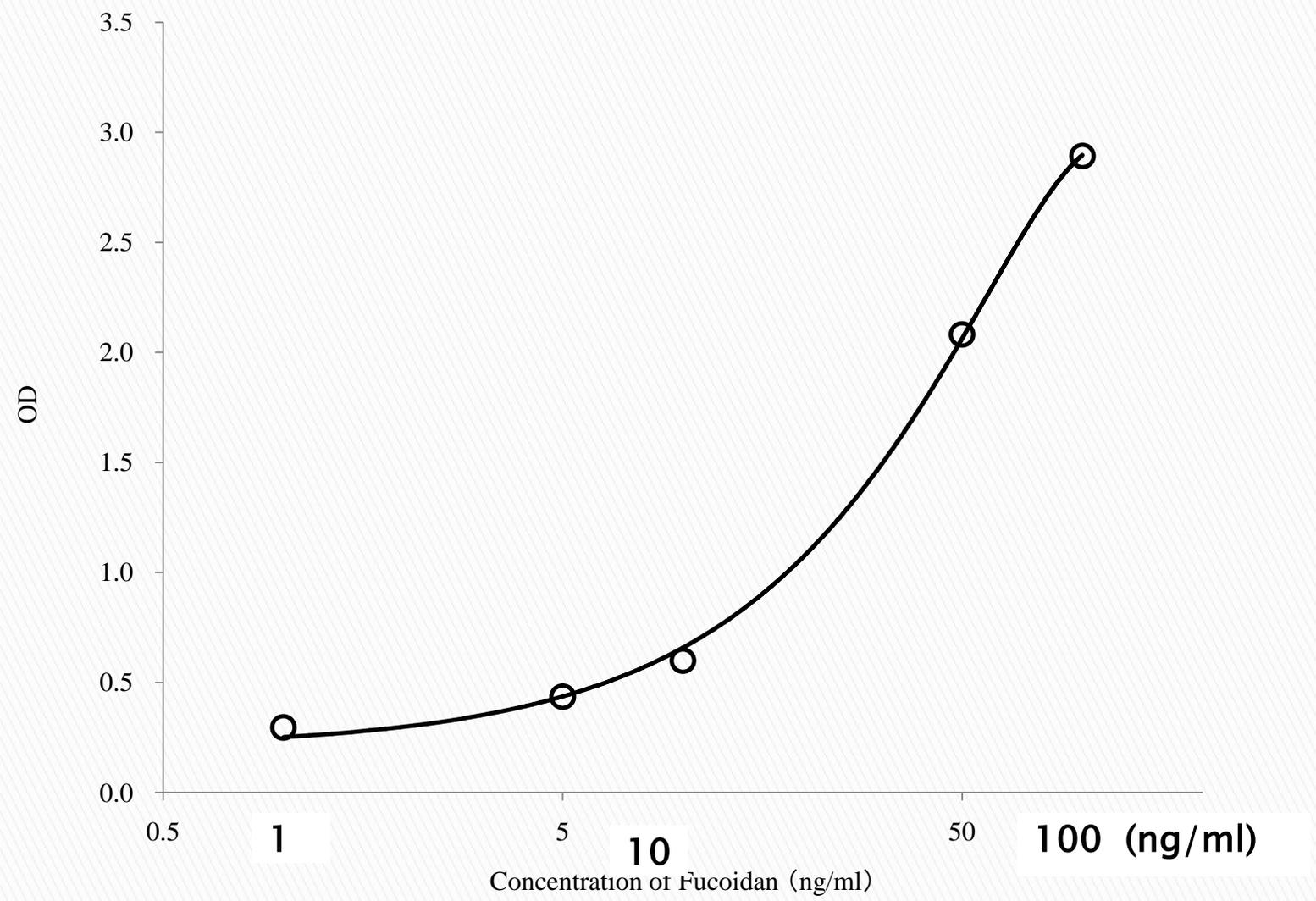
a) Single Affinity Purification



b) Double Affinity Purification

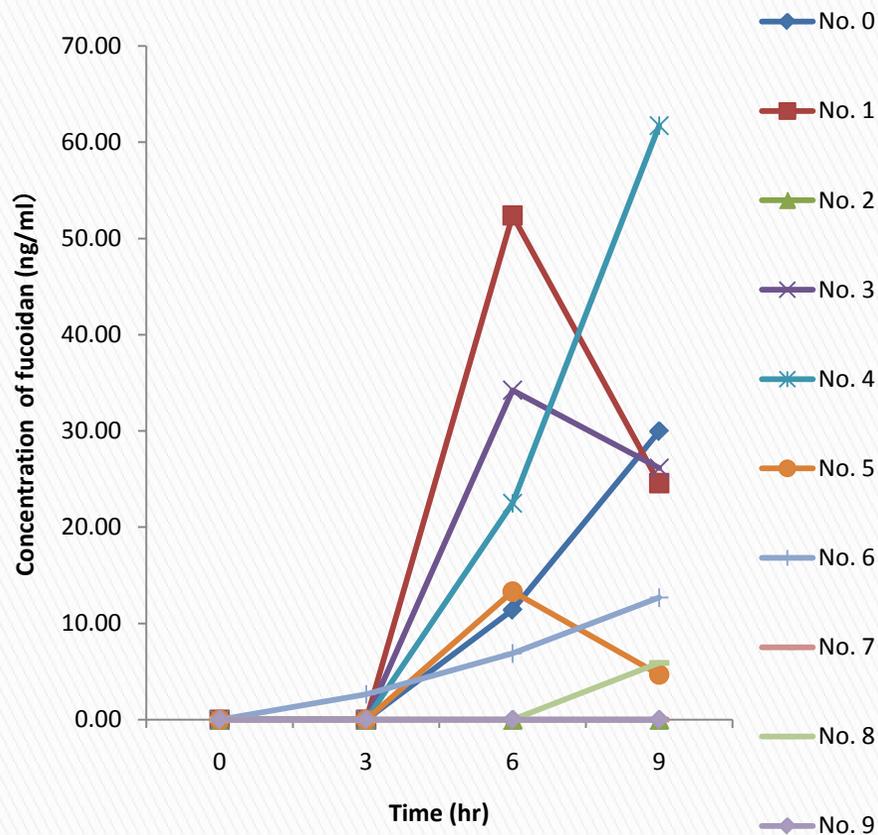


Standard Curve For fucoidan Obtained by This ELISA Method.

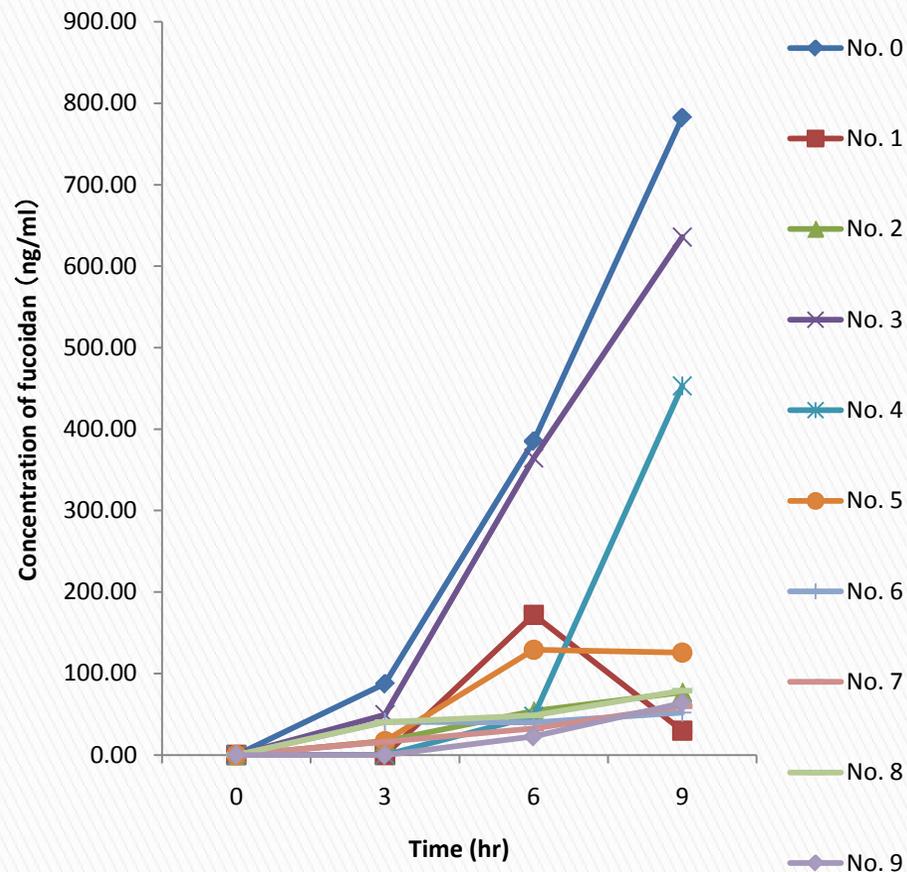


フコイダン1g経口摂取後の血中、尿中フコイダンの変動(成人ボランティア)

a) Serum



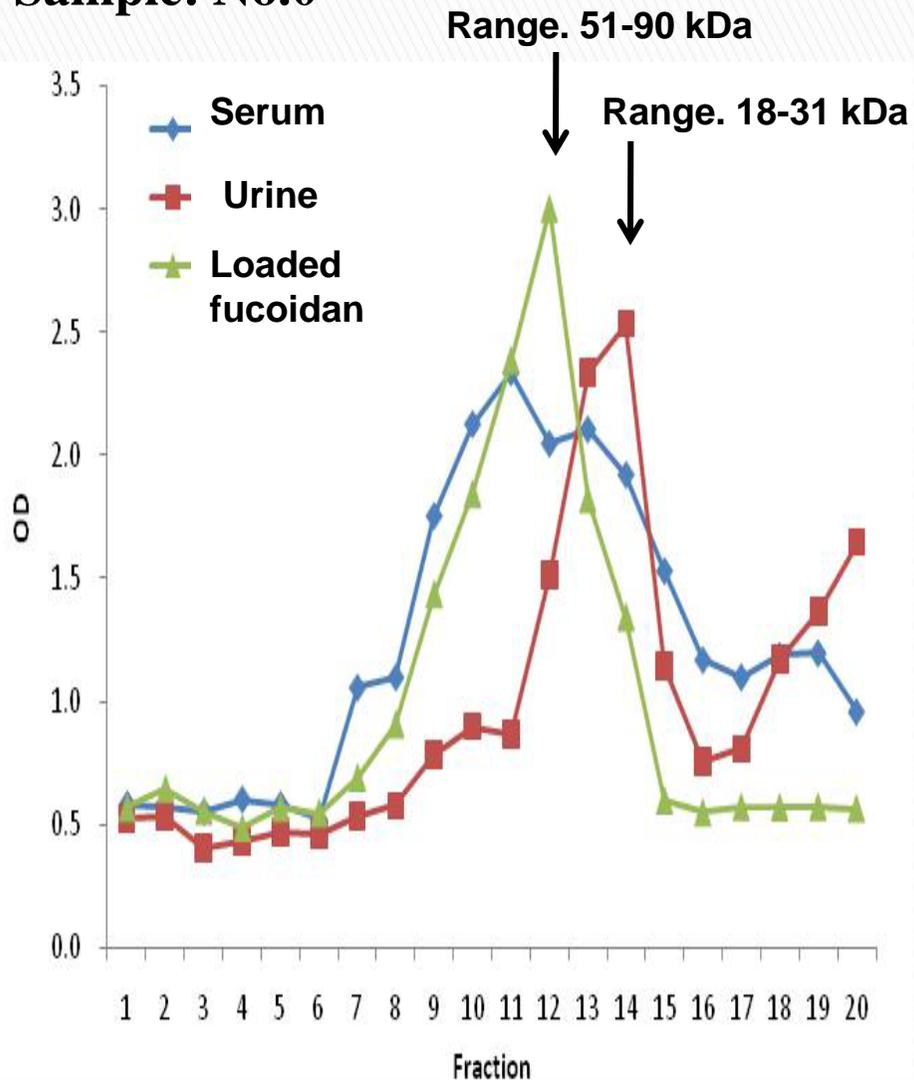
c) urine



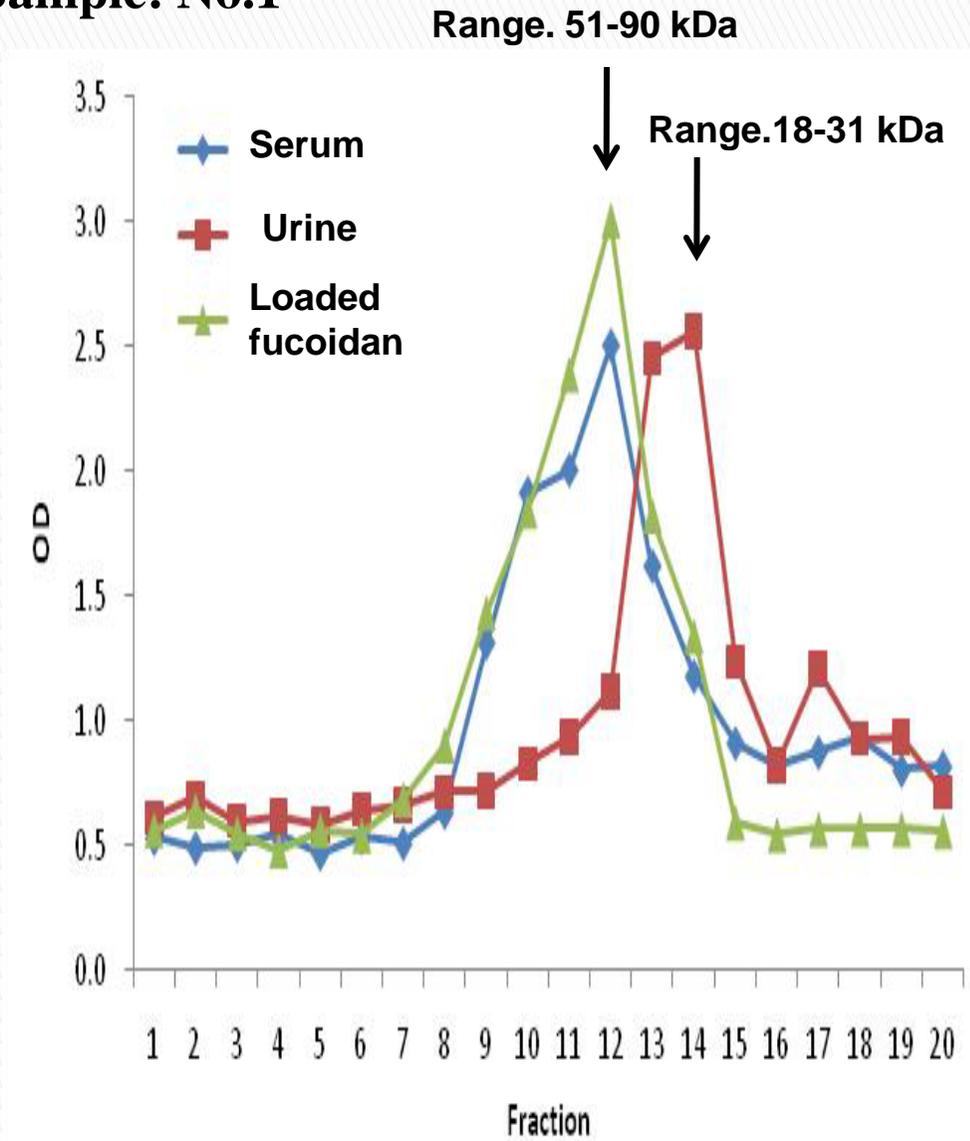
* 血漿フコイダン値は血清と同様に変動

血中及び尿中フコイダンの分子量:ゲルろ過法

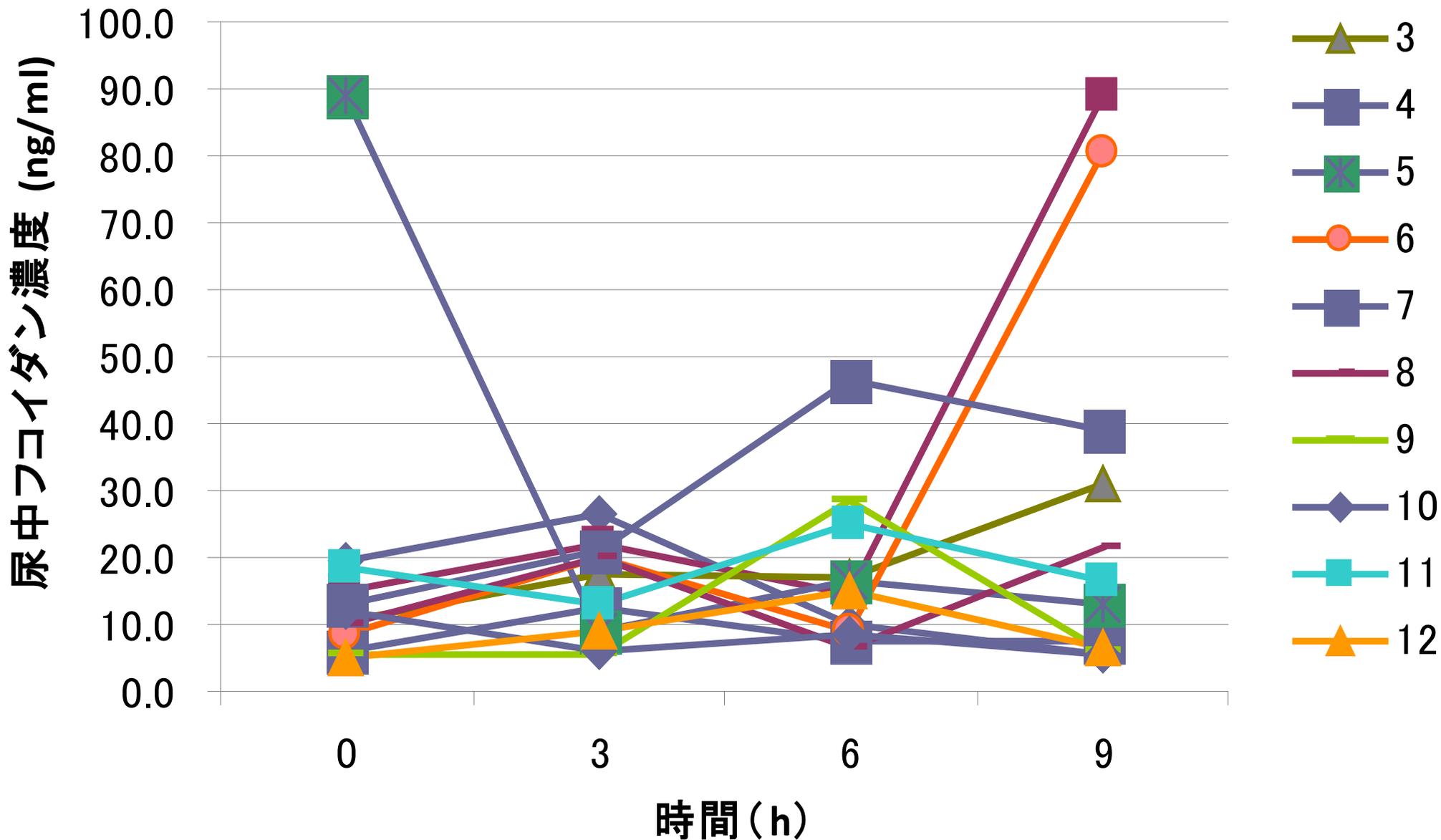
Sample: No.0



Sample: No.1



オキナワモズク100g摂取後の尿中フコイダン値



科学

(火・金掲載)

✉ kagaku@asahi.com

海藻食べる日本人のみ 腸内細菌から消化酵素

仏チーム 英科学誌発表

本来は消化しにくい食物繊維が豊富な海藻を食べていると、消化し栄養として吸収できるようになる――。こんな研究成果をフランスの研究チームが英科学誌「ネイチャー」電子版に発表した。日本人と米国人らの腸内細菌を調べたところ、すしのノリなど海藻を

食べる文化がある日本人からのみ消化酵素が見つかった。

チームは31人の腸内細菌の遺伝子を分析した。日本人は13人中5人から海藻を消化する酵素が見つかり、海藻を食べる習慣のない米国人ら18人は全員見つからなかった。この酵素は海藻をえさにしている海の微生物が持っており、この微生物の遺伝子を腸内細菌が取り込んだと研究チームはみている。

東京大の服部正平教授は「胎児の時には腸内細菌を持たない人間が、消化酵素を獲得する過程を示した研究は非常に珍しい」と話している。

(杉本崇)

- Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota.
- Jan-Hendrik Hehemann, et al.
- ▶ Nature 2010

まとめ

- ▶ フコイダン特異的抗体を用いたサンドイッチELISA系により高感度の血中および尿中のフコイダン定量法を確立した。
- ▶ フコイダン1g経口負荷試験の結果、6-9時間後の血中および尿中で“ng/ml”オーダーのフコイダンが検出された。このことから経口摂取されたフコイダンは消化管から吸収されることが初めて実証された。また、吸収に個人差がある可能性が示された。
- ▶ 血中フコイダンの分子量から、フコイダンが腸管で分解されずに吸収されることを証明した。また、尿中フコイダンの分子量からフコイダンが体内で分解されている可能性が示唆された。
- ▶ オキナワモズクを摂取した1/3の症例で尿中フコイダンが検出された。
- ▶ 本フコイダンELISA測定系は臨床検体のフコイダン測定に応用できる。

ご清聴ありがとうございました



オキナワモズク養殖場
(沖縄県)