

液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いたアルギン酸オリゴマーの高感度定量法の確立及びその経口投与後のマウス及びマハタにおける体内動態解析

長崎大学大学院生産科学研究科

西川 徹

アルギン酸オリゴマーについては多くの生理活性が報告されているが、アルギン酸オリゴマーを高感度で定量する分析法や、経口投与における消化管吸収を *in vivo* で確認している報告はほとんどない。しかしながら、健康食品や飼料の開発という研究の出口を考えた場合、高感度分析法や、経口投与で消化管から吸収されるかどうかの知見は重要である。オリゴ糖の分析法については誘導体化して HPLC で測定する方法が主流だが、感度は良いものの、操作が煩雑であり、選択性がないことが問題である。これらの背景から、筆者は液体クロマトグラフ-タンデム質量分析器 (LC-MS/MS) を用いた分析法を確立し、マウスとマハタにおけるアルギン酸オリゴマーの体内動態に関する知見の集積を試みた。また近年、アルギン酸添加飼料をエビやタラに給餌することにより、病原体に対して抵抗性が上昇するという報告があるが、アルギン酸オリゴマーを魚類へ給餌した報告は見当たらない。そこで高級魚の一種であり、養殖が困難とされているマハタを用い、アルギン酸オリゴマーの生理活性について、基礎的知見の集積を試みた。

アルギン酸オリゴマーのポジティブイオン化を試みたところ、アンモニウムイオン付加体 ($[M+NH_4]^+$) が容易に生成することが分かった。更にプレカーサーイオンとしてアンモニウムイオン付加体を選択し、電圧をかけて生成するフラグメントイオンは 2~4 量体の全てで m/z 141 であった。調製したアルギン酸オリゴマーには 3 量体が一番多く含まれていたことから、3 量体をターゲットとした MRM (m/z 546 \rightarrow 141) を設定し、そのピーク面積比よりアルギン酸オリゴマーの濃度を算出した。また、検出感度は $0.05 \mu\text{g/ml}$ であった。分離について、陰イオン交換樹脂カラムを検討したところ、第 4 級アンモニウムイオンを付加させた弱陰イオン交換樹脂 (TSK-gel super IC-AP) に、移動相を 100 mM ギ酸アンモニウム溶液にすることにより、オリゴマー中の 2 量体~4 量体を分離することが可能であった。

マウス血漿や尿試料の前処理法について検討したところ、血漿サンプルにおいては 5% 過塩素酸溶液による除タンパク法を行う方法により前処理を行うこととした。尿サンプルについては移動相で希釈し、ろ過するだけの簡易な前処理で測定した。本法における回収率は 80%

以上であり、繰り返し測定による再現性も確認された。

アルギン酸オリゴマーをマウスへ経口投与後の消化管吸収をみたところ、投与量に比べれば少量ではあるが、少なくとも2量体～4量体のアルギン酸オリゴマー血中に移行しているということが確認された。単回経口投与後の経時変化をみたところ、アルギン酸オリゴマーの一部は投与後直ぐに消化管より吸収され、それから速やかに尿細管からの再吸収なしに尿中排泄されることが示唆された。

マハタの血漿サンプルの前処理法について検討したところ、除タンパク後の血漿上清をODSミニカラムで精製することにより、測定は可能であった。また、回収率も80%以上と良好であった。マハタにアルギン酸オリゴマー混合試料を給餌して6時間後にはアルギン酸オリゴマーが吸収されていることが分かった。しかしながらマウスの場合とは異なり、投与から54時間後でも血中からアルギン酸オリゴマーが検出された。これは海水魚の場合、マウスと比較して尿量が少ないことから排泄速度が異なることが考えられる。このことからアルギン酸オリゴマーの排泄経路が尿排泄に大きく依存していることが示唆された。

アルギン酸オリゴマーを魚用一般飼料と混合し、アルギン酸オリゴマー混合飼料の摂餌による成長速度への影響を調査したところ、コントロール飼料給餌グループと5%アルギン酸オリゴマー混合飼料給餌グループの両方で、体長及び体重の成長速度に差はみられなかった。アルギン酸オリゴマー混合飼料の給餌が中枢性神経壊死症に及ぼす影響を調べたところ、外海に放流して30日を過ぎたあたりから生存率に差が付き、60日後にはコントロール飼料給餌グループの生存率がそれぞれ21%、5%アルギン酸オリゴマー混合飼料給餌グループの生存率が54%であった。本実験より5%アルギン酸オリゴマー混合飼料の給餌がマハタの健康状態になんらかの影響を及ぼし、生存率が向上した可能性が示唆された。アルギン酸オリゴマーをマハタへ単回腹腔内投与し、血漿中サイトカインについて調べたところ、5%アルギン酸オリゴマー混合飼料給餌グループのマハタ血漿からTNF- α などのサイトカイン類が検出された。このことからアルギン酸オリゴマーがマハタに対して免疫賦活作用を示すことが示唆された。