

2020年度 博士論文

アルギン酸カルシウムの食品成分としての  
機能性に関する研究

**Study on the functionality of calcium alginate  
as a food ingredient**

高崎健康福祉大学大学院薬学研究科

笠原文善

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、高崎健康福祉大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Kasahara F, Kato T, Idota Y, Takahashi H, Kakinuma C, Yano K, Arakawa H, Hara K, Miyajima C, Ogihara T.

Reduction Effect of Calcium Alginate on Blood Triglyceride Levels Causing the Inhibition of Hepatic and Total Body Accumulation of Fat in Rats.

*Biol Pharm Bull.* 2019;42(3):365-372.

2. Idota Y, Kogure Y, Kato T, Ogawa M, Kobayashi S, Kakinuma C, Yano K, Arakawa H, Miyajima C, Kasahara F, Ogihara T

Cholesterol-Lowering Effect of Calcium Alginate in Rats,

*Biol Pharm Bull.* 2016;39(1):62-67.

3. Idota Y, Harada H, Tomono T, Morimoto K, Kobayashi S, Kakinuma C, Miyajima C, Kasahara F, Ogihara T.

Alginate enhances excretion and reduces absorption of strontium and cesium in rats.

*Biol Pharm Bull.* 2013;36(3):485-91.

## 目次

Abstract.....	3
略語一覧.....	5
第1章.....	6
1-1 食物繊維について.....	6
1-2 アルギン酸について.....	8
1-3 アルギン酸カルシウムについて.....	13
第2章.....	15
2-1 序.....	15
2-2 実験.....	17
2-3 結果.....	20
2-4 考察.....	31
第3章.....	34
3-1 序.....	34
3-2 実験.....	35
3-3 結果.....	37
3-4 考察.....	41
第4章.....	43
4-1 序.....	43
4-2 実験.....	44
4-3 結果.....	46
4-4 考察.....	54
第5章.....	55
引用文献.....	62
謝辞.....	71

## **Abstract**

### **Study on the functionality of calcium alginate as a food ingredient**

Alginic acid (Alg) is a polysaccharide derived from algae. Sodium alginate (Na-Alg) is commonly used in foods as a thickening agent, gelling agent, and stabilizer, and is also used as a health food to suppress weight gain and lower blood cholesterol (Cho). In addition, Na-Alg has a protective action on the gastric mucosa. Moreover, when Na-Alg is ingested prior to exposure to strontium (Sr), Sr accumulation in the human body is decreased.

Na-Alg (sodium salt), however, can potentially cause hypertension, a major risk factor for dyslipidemia and arteriosclerosis. Therefore, if the calcium salt (Ca-Alg) is as effective as, or superior to Na-Alg, it may prove a greater benefit, therefore, the physiological effects of calcium alginate was studied.

First, the increase of blood triglyceride (TG) levels in rats fed a high-fat diet for 5 weeks was significantly suppressed by Ca-Alg, leading to decreased fat accumulation in the liver and the entire body.

Ca-Alg reduce plasma Cho in rats fed a high-Cho diet for 2 weeks. This was considered to be due to reduced intestinal reabsorption of bile acid, resulting from the binding of Ca-Alg and bile acid; the binding induces an increase of bile acid synthesis from Cho in the liver, leading to a decrease in Cho in the plasma.

Results from an experiment using rats on absorption suppression and excretion promoting effects for Sr and cesium (Cs) by Ca-Alg, revealed that Ca-Alg is effective not only for Sr but also for Cs.

Alg can be ingested with Na salt, K salt, or eaten in its seaweed form. Caution is needed with Na or iodine consumption since it can lead to disease. Excessive intake of Na is becoming more common and this can lead to hyperkalemia. Therefore, when taking K-containing supplements, caution and appropriate medical management is required. Caution is needed with seaweed as well, since it contains iodine, when consumed in excess, is known to cause serious diseases such as thyroid disorders.

On the other hand, calcium deficiency is becoming more common in Japan. The average intake of calcium in the Japanese population is well below the recommended daily intake, and even lower than the lowest observed adverse effect level (LOAEL).

Ca-Alg not only compensates for insufficient intake of Ca, but also has many uses as a functional food ingredient and is expected to be used as a safe food ingredient.

## 要旨

### アルギン酸カルシウムの食品成分としての機能性に関する研究

アルギン酸は、褐藻類由来の多糖類であり、アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) は、食品の増粘剤、安定剤、ゲル化剤などとして一般的に多用されている。また、健康食品としても体重増加の抑制、血中コレステロール濃度の低下などに用いられ、さらに Na-Alg は胃粘膜保護作用を持ち、そして予め Na-Alg を摂取しておくことによりヒトが放射性ストロンチウム (Sr) に被曝した際の Sr 体内蓄積量を抑制できることが報告されている。

しかしながら、ナトリウム塩は高血圧症の主因であるとともに脂質異常症や動脈硬化症の主なリスク因子でもある。したがって、もしアルギン酸のカルシウム塩 (Ca-Alg) に Na-Alg と同等、もしくはそれ以上の効果があれば、非常に大きな利点がある。我々は、Ca-Alg の生理作用に焦点を当てて研究してきた。

本論文においては、先ず高脂肪食を 5 週間与えられたラットの血中トリグリセリド (TG) レベルの上昇が Ca-Alg により明らかに抑制され、それに伴い肝脂肪ならびに体脂肪の蓄積も減少することを明らかにした。

さらに高コレステロール食を 2 週間与えられたラットにおける Ca-Alg による血中コレステロール濃度の低下作用について明らかにした。これは Ca-Alg が胆汁酸と結合することによって、腸における胆汁酸の再吸収が阻害されるため、肝臓におけるコレステロールを原料とする胆汁酸の合成が促進されることにより血中コレステロール濃度が減少したものと考えられる。

また、Ca-Alg による Sr とセシウム (Cs) の排泄促進と吸収抑制効果についてラットを用いた実験の結果、Ca-Alg においては、Sr のみならず Cs に対しても有効であることが明らかとなった。

Alg を摂取するためには、Na 塩、K 塩での摂取や、海藻そのものを食べる等の方法があるが、Na は過剰摂取が常態化しており、K 含有サプリメントの服用には、高カリウム血症への配慮から十分な注意と医学的管理が必要とされる。また、海藻に含まれるヨウ素の過剰摂取は、甲状腺異常症など深刻な疾病をもたらすことが知られている。

一方で、Ca は、欠乏が常態化しているミネラルであり、日本人の推定平均摂取量は最低健康障害発現量を大幅に下回り、摂取必要量をも下回っている。

Ca-Alg は、Ca の摂取不足を補うばかりでなく、機能性食品素材として多くの有用性を持ち、安全な食品素材として利用されることが期待される。

## 略語一覧

Alg	アルギン酸
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
Ca-Alg	アルギン酸カルシウム
Cho	コレステロール
CKD	慢性腎臓病
G	グルロン酸
GLU	血糖
HDL	高密度リポタンパク質
HF	高脂肪
K-Alg	アルギン酸カリウム
LDL	低密度リポタンパク質
M	マンヌロン酸
NEFA	遊離脂肪酸
PL	リン脂質
RMD	難消化性デキストリン (resistant maltodextrin)
TG	中性脂肪 (トリグリセリド)

# 第 1 章

## 緒言

### 1-1 食物繊維について

食物繊維 (Dietary fiber) は「ヒトの消化酵素で消化されない食物中の難消化性成分の総体」と定義されている。古代ギリシャ時代から穀物の籾殻には便秘を防止する作用のあることが知られてはいたが、長い間食物繊維は栄養的には価値のないものと認識されていた (1)。

しかし 1918 年には、J. H. Kellog により大腸炎および便秘症の改善に wheat bran (小麦ふすま) が有効であることが確認され (2)、1953 年に英国人医師 Eben Hipsley により初めて “dietary fiber” という用語が学術誌に使用された (3)。1970 年代には、Trowell らにより西欧人の食餌に繊維が不足していることが心臓病と結腸がん、直腸がんの発症率が高い大きな要因であると結論付けられ (4, 5)、1974 年に同氏により初めて “Dietary fiber” が下記のごとく定義された。“Dietary fiber consists of the remnants of edible plant cells, polysaccharides, lignin, and associated substances resistant to digestion by the alimentary enzymes of humans” (食物繊維とは、多糖類、リグニン及びその関連成分など植物の細胞壁成分でヒトの消化酵素で分解されないもの) (6)。

その後、動物性の食物繊維や、加工でんぷんの一種である難消化性デキストリンなどの新素材、オリゴ糖やマルチトールのような低分子のものも加えられるようになり、更に多くの食物繊維は大腸において腸内細菌による発酵を受け、短鎖脂肪酸に分解されエネルギー源として利用されることも明らかになった。近年では、小腸で消化・吸収されずに大腸に到達する食品成分をすべて食物繊維に含める広義の解釈がなされるようになった。(7)

食物繊維は、水への溶解性の違いにより水溶性食物繊維と不溶性食物繊維とに分けられ、各々の持つ特性の違いから生理作用も異なる。

水溶性食物繊維ではペクチンやアルギン酸のように水に溶けて高い粘性を示すものが多く、摂取することにより消化管内容物は粘度を増し、これにより栄養素や消化酵素の拡散が抑制され、栄養素の消化吸収が緩慢になる。さらにこれらの水に溶けた食物繊維の中にはイオン交換能を持つものもあり、糖尿病、高脂血症、高血圧、高コレステロール血症、胆石症などの疾患予防に関連が深いとされる。

一方のセルロース、ヘミセルロースなどの不溶性食物繊維は、保水性を持つことから、消化管内で水分を吸収し消化管内容物のカサを増やし、食物の消化管通過時間を短縮して排

便回数ならびに便量の増加をもたらす。そのため便秘、憩室炎、大腸がんなどの予防との関連が深いとされる（7）。

食物繊維の摂取と生活習慣病の発症率や死亡率については多くの研究成果が報告されている。代表的なものとして、総死亡率（8）、心筋梗塞の発症及び死亡（9）、脳卒中の発症（10、11）、循環器疾患の発症及び死亡（9、12、13）、2型糖尿病の発症（14、15）、乳がんの発症（16、17）、胃がんの発症（18）、大腸がんの発症（19、20）などがある。例えば、食物繊維をほとんど摂取しない群に比べて、20g/日程度摂取していた群では心筋梗塞の発症率が15%ほど低かったと報告されている（9）。また、メタボリックシンドロームの発症率との関連を検討したメタ・アナリシスも存在する（21、22）。これらの報告から総合的に判断すると、食物繊維摂取量が多いほどこれらの発症率や死亡率が低くなる傾向が認められる。

2型糖尿病の発症率との関連を検討したメタ・アナリシスでは、食物繊維を20g/日以上摂取した場合に発症率の低下が観察されている（15）。血中総コレステロールおよびLDLコレステロールとの負の相関も報告されているが、これは水溶性食物繊維に限られている（23）。また、ヨーロッパで行われた大規模コホート研究では、食物繊維摂取量と体重増加との間に負の相関が観察されている（24）。

食物繊維摂取量が排便習慣に影響を与えることが示唆されている（25）。食物繊維摂取量と便秘症罹患率との関連を検討した疫学研究では、便秘症の罹患率、発症率と食物繊維摂取量との間に負の相関を認めたとする報告がある（26）。

食物繊維が各種生体指標に及ぼす効果を検証した介入試験をまとめたメタ・アナリシスでは、体重、血中総コレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド、収縮期血圧、空腹時血糖で有意な改善が認められ、25~29g/日の摂取量で最も顕著な効果が観察されたと報告しており（27）、アメリカ・カナダの食事摂取基準では、24g/日以上を摂取の目安量としている（28）。

2020年版「日本人の食事摂取基準」（厚生労働省）では、性別及び年齢区分ごとの摂取目標量を算出しているが、成人の男性で20g/日以上、女性で17g/日以上としている（29）。しかし、平成30年国民健康・栄養調査によると、日本人の食物繊維摂取量の中央値は13.7g/日であり、全ての年齢区分で摂取目標量を下回っている（30）。1952年の日本における平均食物繊維摂取量は20.5g/日であったので（31）、かつては摂取目標量を満たす水準であったが、食生活の急激な変化により現在では摂取不足が常態化している。



## 1-2 アルギン酸について

アルギン酸は、コンブやワカメに代表される褐藻類の主に細胞間質として存在する多糖類、食物繊維である。1883年に英国の E. C. C. Stanford が褐藻類を希薄なアルカリ液に浸漬して得られた粘りのある水溶液に酸を添加したとき得られた析出物に対して Alginic acid と命名した。(32)。

1964年に Linker が *Pseudomonas aeruginosa* などの菌類からもアルギン酸の存在を確認し、アルギン酸は海藻類に特有のものとは言えなくなったが(33)、現在商業的に生産されるアルギン酸はすべて褐藻類を原料としている。

アルギン酸の褐藻中の含有量は乾燥藻体の 30%~60%を占め、生きた海藻の体内では様々な陽イオンと塩を形成し緩やかなゼリー状態で細胞間を充填している。波にもまれながら生育する海藻の柔軟な藻体はアルギン酸の独特な物性によるものといわれている。

### アルギン酸の化学構造

アルギン酸は C-6 位が -COOH になったウロン酸から構成される直鎖状の酸性多糖類で、 $\beta$ -D-マンヌロン酸 ( $\beta$ -D-mannuronic acid) (M) と、 $\alpha$ -L-グルロン酸 ( $\alpha$ -L-guluronic acid) (G) からなる 1,4 結合の共重合体である (Fig. 1-1)。M のみからなる M ブロックと、G のみからなる G ブロック、M と G からなる MG ブロック、3つの型のセグメントから成り立っている (Fig. 1-2)。

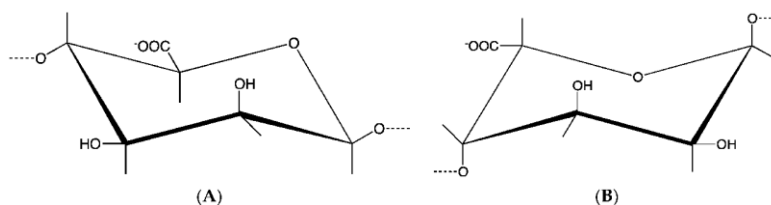


Fig.1-1. Structure of Alginate

(A)  $\alpha$ -L-guluronic acid (B)  $\beta$ -D-mannuronic acid

(引用元: *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):1976)

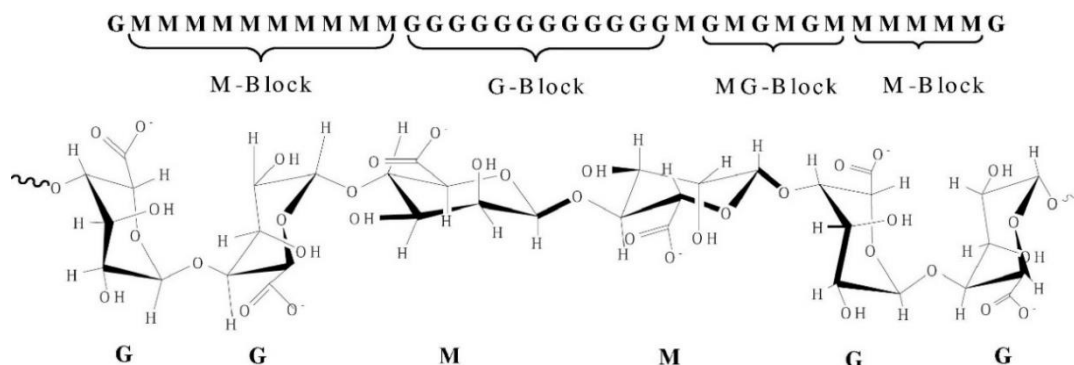


Fig.1-2. M block and G block

(引用元: *Arab. J. Chem.*, (2017)10, S3707-S3714)

### M/G 比

アルギン酸を構成する  $\beta$ -D-マンヌロン酸 (M) と、 $\alpha$ -L-グルロン酸 (G) の比率 (M/G 比) は、海藻の種類や部位によって異なる (Table 1-1)。アルギン酸は M/G 比の違いから G-rich, M-rich, 中間タイプの 3 つに分けられ、G-rich タイプのアルギン酸からは強度の高い剛直なゲルが、M-rich タイプからは柔軟なゲルが得られる (Fig. 1-3)。

G ブロックのグリコシド結合は axial-axial 構造をとり、その形をバックル型、equatorial-equatorial で結合している M ブロックの形を平たんなリボン型と呼んでいる。それぞれ金属イオンとの親和性が異なるが、特にバックル型の G ブロックが二つ向き合って配向すると、ちょうど卵ケースに卵が収まるようにカルシウムイオンを囲い込み安定化することから“Egg Box Junction”と呼ばれ、アルギン酸塩水溶液のゲル化に重要な役割を担っている (Fig. 1-4)。

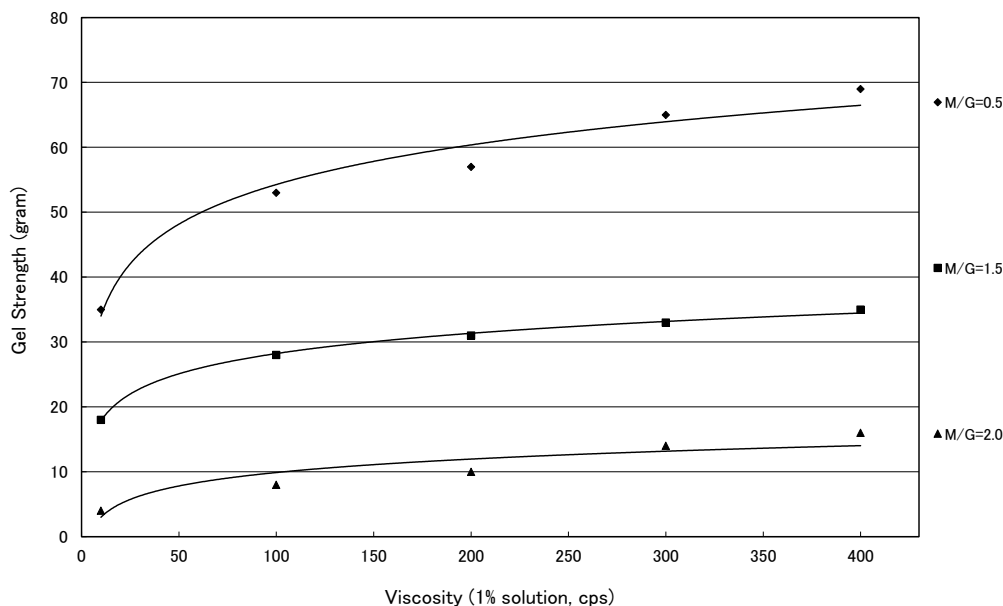


Fig.1-3. Difference in M / G ratio and gel strength (引用元: キミカ社内データ)

Table1-1. Difference in M/G ratio depending on the type and site of seaweed

Name	M [%]	G [%]	M/G	
<i>Lessonia nigrescens</i>	57	43	1.3	
<i>Lessonia flavicans</i>	34	66	0.5	
<i>Macrocystis pyrifera</i>	64	36	1.8	
<i>Ecklonia maxima</i>	63	37	1.7	
<i>Laminaria japonica</i>	69	31	2.2	
<i>Laminaria hyperborea</i>	Stem	38	62	0.6
	Leaf	55	45	1.2
<i>Laminaria digitata</i>	54	46	1.2	
<i>Durvillea antarctica</i>	69	31	2.2	
<i>Durvillea potatorum</i>	70	30	2.3	
<i>Ascophyllum nodosum</i>	66	34	1.9	

(引用元 : *Carbohyd. Res.*32(1974) 217-225)

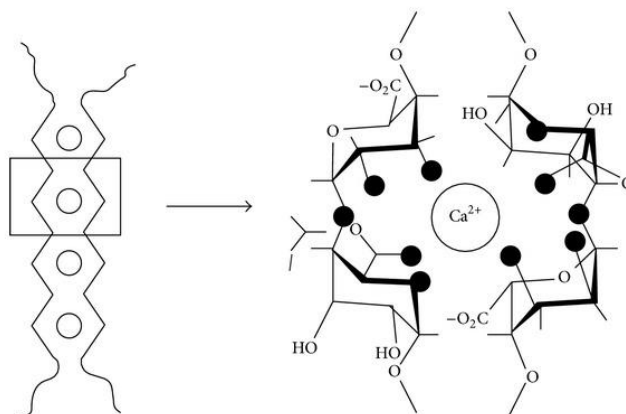


Fig.1-4. Egg Box Junction

(図の引用元: *ISRN Pharm.* 2014:926157)

## アルギン酸の性質

アルギン酸は完全にリニアな高分子で分岐がなく、各ウロン酸ユニットに1個ずつ付いたカルボキシル基は解離しやすいため、水に溶けたアルギン酸塩はアニオン電荷が均一でイオン交換能が高い。酸性下では遊離酸となり水に不溶だが、ナトリウムに代表される1価カチオンと塩を形成すると水に溶け、極めてニュートンフローに近い滑らかな流動性を持った水溶液となる。そして、アルギン酸塩の最大の特徴は、カルボキシル基と対をなす陽イオンの種類によって物性が著しく変化することである。なめらかで高い粘性を示す水溶液から、しっかりとしたゲル構造まで、アルギン酸塩の物性はイオン交換により速やかに変化する。アルギン酸塩の水溶液は、カルシウムに代表される多価カチオンによって分子間イオン架橋され、増粘、ゲル化が瞬時に起き、多価カチオンへの置換が進むと不溶化する (Fig.1-5)。そして生じたハイドロゲルは耐熱性を有する。

アルギン酸は、こうしたカルボキシル基のもつ解離性とイオン交換能のためにさまざまな機能を発揮し、増粘剤、安定剤、ゲル化剤、テクスチャーの調整剤などとして食品を中心とした幅広い分野で活用されている。

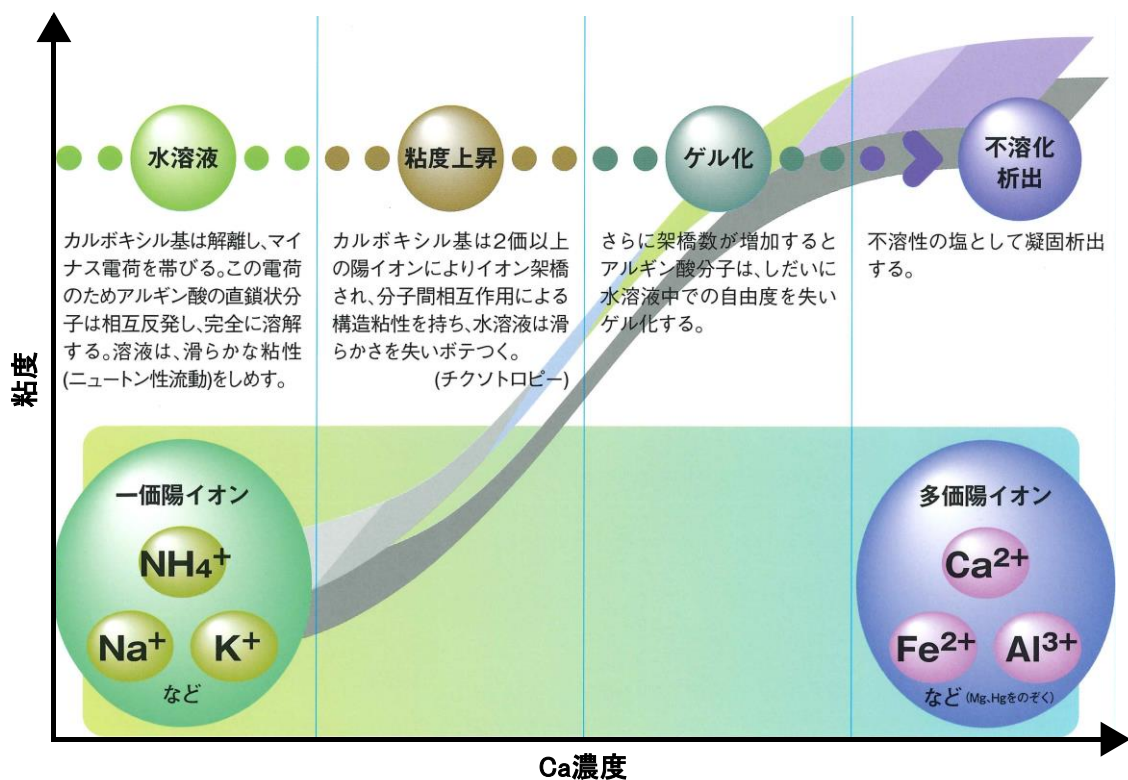
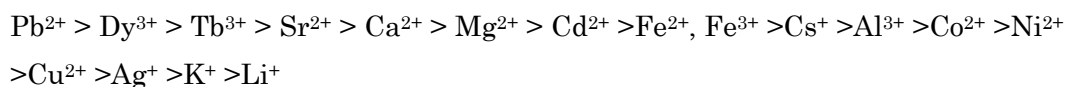


Fig.1-5. Reactivity of alginic acid with multivalent cations  
(引用元：株式会社キミカ アルギン酸カタログ)

半面、このカルボキシル基の鋭敏な反応性のために酸性領域や高濃度の塩類、特にカルシウムの共存する条件下ではゲル化や析出、凝集沈殿を起こす場合があり、利用の妨げとなることがある。そこで、この鋭敏なカルボキシル基をエステル化してプロピレングリコール基を導入し耐酸性、耐塩性を付与したアルギン酸プロピレングリコールエステルが広く利用されている。

#### アルギン酸と金属イオンとの親和性

アルギン酸の各種金属イオンとの親和性について調べた実験報告によると、アルギン酸に対する親和性の順序は(34)、



となっている。この金属イオンとの親和性を活かした利用方法の一つに環境中に放出された重金属の吸着がある。一般に河川や土壌の環境中に放出された重金属は環境負荷が大きく、またその回収には非常に困難である。アルギン酸の持つイオン交換能を利用しそれらの吸着を試みる研究が行われている(35, 36)。また、同様の原理を用いて、環境中からレアアースを回収する試みもある(37)。

#### 食品添加物としてのアルギン酸とその安全性

米国および欧州連合(EU)においては、アルギン酸とそのナトリウム塩、アンモニウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アルギン酸プロピレングリコールエステルが食品添加物として指定されており、米国食品医薬品局(FDA)では、アルギン酸およびその塩類をGRAS(Generally Recognized As Safe:一般に安全と認められる物質)に指定している(38)。

また、JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives :FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議)では、アルギン酸およびその塩類に対してグループADIを1973年には「アルギン酸として0~25 mg/kg体重/日」と設定したが、1992年に追加データを評価し、「not specified(1日許容摂取量を特定しない)」とした(39)。すなわち、きわめて安全な食品添加物として認知されている。

日本においては、昭和32年にアルギン酸、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸プロピレングリコールエステルの三品目のみが食品添加物として指定されたが、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩類は長く指定外とされてきた。しかし厚生労働省は食品流通の国際化に対応するため、平成14年7月の薬事・食品衛生審議会での了承事項に従い、①JECFAで国際的に安全性評価が終了しており、②米国およびEU諸国で使用が広く認められ国際的に必要性が高いと考えられる食品添加物46品目の指定に向けた検討を開始、平成18年にアルギン酸カリウム、アルギン酸カルシウム、アルギン酸アンモニウムが追加指定された(40, 41)。

### アルギン酸の生理作用について

特定保健用食品として、便通改善、血中コレステロールの低下を効能とした商品が販売されている（42,43）。また、胃粘膜保護などを目的にアルギン酸ナトリウム水溶液が内服薬として流通している（44-46）。また、食後血糖値の上昇を抑制する効果を謳ったうどんが機能性表示食品として市販されている（47）。

さらに、予めアルギン酸ナトリウムを摂取しておくことにより放射性ストロンチウムに被爆した際の放射性ストロンチウム体内蓄積量を抑制できることが報告されており、国際原子力機関（IAEA）では、放射性ストロンチウムの体外排泄にアルギン酸ナトリウムの服用を推奨している（48）。

### 1-3 アルギン酸カルシウムについて

アルギン酸ナトリウムとアルギン酸カリウムに関しては、食物繊維としての機能性について様々な研究報告がなされている。また、血中コレステロールの低下や便通改善効果を謳った特定保健用食品も市販されているが、これら一価の金属塩は水溶性であるため、経口摂取時に強い粘性による不快感（糊っぽさ）を伴い、しばしば嚥下困難な場合もある。

そこでアルギン酸を加水分解して低分子化し、粘度を大幅に下げた「低分子化アルギン酸ナトリウム」が商品化されている。低分子化することにより生理作用は変わらないという特許も権利化されているが、低分子化しても効果が変わらないメカニズムについては明らかにされていない（49）。

#### ナトリウムの過剰摂取について

2012年のWHOのガイドライン（50）によれば、成人のナトリウム摂取量は、食塩相当量として5g/日未満が強く推奨されている。一方、厚生労働省の平成30年「国民健康・栄養調査」によると、日本人のナトリウム摂取量の総平均値は食塩相当量で9.7g/日（30）、成人のナトリウム摂取量（食塩相当量）の分布においてWHOの推奨する5g/日は下方5パーセント値付近となり、習慣的な摂取量として5g/日未満を達成するのは極めて難しく、過剰摂取が常態化しているミネラルである。

#### カルシウムの欠乏について

カルシウムは、体重の1~2%を占め、その99%は骨および歯に存在し、残りの1%は血液や組織液、細胞に含まれる。血液中のカルシウム濃度は比較的狭い範囲（8.5~10.4mg/dL）に保たれており、濃度が低下すると副甲状腺ホルモンの分泌が増加し、主に骨からカルシウムが溶出して濃度を維持する。従ってカルシウムの欠乏は骨の粗鬆化を引き起こす（51）。

カルシウム摂取量と骨量、骨密度、骨折との関係を検討した疫学的研究をまとめたメタ・アナリシスによると、摂取量と骨量、骨密度の間には有意な相関が認められている（52-54）。カルシウム摂取量と骨折発生率との関連を検討した我が国における疫学研究でも、有意な相関が認められている（55）。さらにカルシウム摂取量と高血圧症との関係について、カルシウム摂取量の増加に伴い収縮期血圧の平均値が有意に低下すること（56-58）、介入試験のメタ・アナリシスでも収縮期、拡張期の血圧がともに有意な低下を示したと報告されている（59）

一方、厚生労働省の「日本人の食事摂取基準（2020年版）」（29）によれば、カルシウムの摂取推奨量は30歳～74歳の男性で750 mg/日、女性で650 mg/日とされているが、平成30年「国民健康・栄養調査」（30）によると、摂取量の総平均は505 mg/日であり、欠乏が懸念されるミネラルとなっている。

### アルギン酸カルシウムの優位性

本研究においては、既に広く使用されている水溶性の低分子化アルギン酸ナトリウムに替えて、水に不溶性のアルギン酸カルシウムを用いることにより、より安全で、保健効果が高く、服用しやすい新素材を開発することを目指した。

具体的には

- \* 粘性による飲み難さを解決する。
- \* アルギン酸を高分子量のまま高用量で服用することが可能となる。
- \* ナトリウムの過剰摂取を防ぐ。
- \* 欠乏が懸念されるカルシウムの補給源となる。

こうした様々な利点が得られることから、アルギン酸カルシウムの食品成分としての機能性、特に脂肪の吸収抑制効果、血中コレステロール濃度低下作用、放射性ストロンチウム、セシウムの体外排泄効果について *in vitro* での吸着試験とラットを用いた動物実験を行ない、その効果を明らかにした。

## 第 2 章

### ラットにおけるアルギン酸カルシウムによる血中トリグリセリド レベルの低下作用と肝臓および全身への脂肪蓄積低減効果

#### 2-1 序

日本の主な死亡原因の一つである心疾患や脳血管疾患は、動脈硬化による血管の損傷、すなわち動脈壁の肥厚と弾力性の喪失が原因であることが多い。したがって、動脈硬化を予防するためには、血管内の脂質やコレステロールの蓄積を抑制する必要がある(60-65)。体内の脂質は、トリグリセリド (TG)、コレステロールエステル、遊離脂肪酸およびリン脂質に大別される。その中でも、脂肪酸はエネルギー生産にすぐに利用されるが(66)、過剰な脂質は TG の形で皮下および内臓に貯蔵され、必要に応じて脂肪酸に分解される(67)。

血中の TG およびコレステロールレベルの増加を伴う脂質異常症は、アテローム性動脈硬化症、循環器疾患、脳卒中を引き起こす可能性がある。さらに、TG の蓄積は脂肪肝をもたらす、肝機能の低下、肝硬変、心筋梗塞、脳梗塞、狭心症などの罹患率の上昇、そして最終的には癌につながる事が知られている(68-71)。

近年、orlistat®が開発され、膵リパーゼの活性を阻害することにより消化管内における脂肪の消化吸収を阻害させることが肥満症の有効な治療法として欧米を中心に普及している(72)。また、食品成分の中にも膵リパーゼ活性を阻害する作用が認められるものがあり、食物繊維についても膵リパーゼ活性に及ぼす影響が研究され、様々な報告がなされている(73, 74)。

我々は今までに Alg に関する様々な物理的パラメータと各種金属イオンとの結合親和性について調べ報告してきた(78)。さらに、Ca-Alg が  $\alpha$ -グルコシダーゼによるマルトースのグルコースへの分解を阻害することにより、ラットおよびヒトにおけるデンプン摂取後の血糖値の上昇を抑制することを明らかにした(79, 80)。また次章において詳述するが、ラットにおける Ca-Alg の血中コレステロール濃度低下効果について報告した(82)。Ca-Alg は、腸内の胆汁酸を吸収し、それらの再吸収と腸肝循環を阻害して、血中の胆汁酸レベルを低下させ、糞中への排泄を促進する。胆汁酸は肝臓でコレステロールから生合成されるため、それらの生合成が促進され、血中コレステロールレベルの低下につながると考えられた(81-83)。その実験中にわれわれは偶然に血中の TG レベルが低下する傾向があるこ



とを発見したが、この TG 低下効果のメカニズムは確認されていない。そこで我々はコレステロールおよび胆汁酸を負荷した食餌の代わりに TG を負荷した食餌を与えられた動物における Ca-Alg の効果を調べることにした。

本研究では、TG を負荷した食餌を 5 週間与えたラットを使用して、血中の TG レベルの上昇、肝臓および全身への脂肪の蓄積、および体重増加に対する Ca-Alg の抑制効果を検討した。また、*in vitro* での実験で Alg の TG 低減効果のメカニズムを調べた。

## 2-2 実験

### 試薬及び動物実験

ラード, TG, コレステロール, コール酸ナトリウム, TG E-test WAKO, Cho E-test WAKO, 総胆汁酸テスト WAKO, 5-スルホサリチル酸 2 水和物, クロロホルム, 水酸化ナトリウム, 塩酸, フェリシアン化カリウム, アラントイン, レシチン (大豆由来) および胆汁粉末は和光純薬工業株式会社から購入使用した。フェニルヒドラジン塩酸塩は、Sigma-Aldrich Co. 製を使用した。グルロン酸を多く含む高分子量の Ca-Alg (重量平均分子量:  $2.4 \times 10^6$ , M/G 比 0.38) は、株式会社キミカから提供された。難消化性デキストリン (resistant maltodextrin, RMD) であるファイバーソル-2 (R) は、松谷化学工業株式会社製を使用した。他のすべての化学物質と溶剤は分析グレードの市販製品を使用した。

通常のラット食餌 (AIN-93) は、日本クレア株式会社から提供された。in vivo 試験においてはこれらの食餌にラード, Ca-Alg, RMD を各条件の比率で混合して使用した。実験動物用体組成計は ImpediVET (ImpediMed Ltd. 製) を使用した。3 週齢雄 SD ラットを日本 SLC 株式会社から購入し、制御された条件下 (温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 10\%$ ) でケージあたり 1 匹を飼育、明暗サイクルは 12 時間とし食餌, 水は自由摂食とした。

動物実験は、高崎健康福祉大学の実験動物の取り扱いと使用に関するガイドラインに従って実施され、同大学の動物実験倫理委員会による承認を受けて実施された。

### アルギン酸塩の消化管内での挙動

試料粉末 (Ca-Alg, Na-Alg, K-Alg) 3.0 g をそれぞれ疑似胃液 (日本薬局方 崩壊試験第 1 液, pH 1.2) 300 mL に分散させ、 $37^\circ\text{C}$  において 2 時間攪拌した。攪拌後、吸引ろ過により試料を回収し、精製水で濾液が中性になるまで洗浄した。その後、回収物を恒量になるまで乾燥させた。乾燥物 1g を磁性ろ過瓶内にて加熱し炭化し、次いで  $650^\circ\text{C}$  の電気炉にて更に加熱し灰化した。灰化後の粉末重量を乾燥物サンプル量で除し灰分 (%) とした。

Ca-Alg については灰化後のサンプルに含まれる Ca 原子含有量を原子吸光法により定量した。灰化後の試料を 10mL の 18% HCl で溶解し、その後 100mL に定容した。定容した液を  $0.2\mu\text{m}$  フィルターにて濾過したのち、5mL を塩化ランタン水溶液 (富士フィルム和光純薬, 124-02351) 2.29mL と混合し試料溶液とした。原子吸光光度計 (iCE 3300AAS, Thermo Scientific) を使用してフレイム法で測定した。

### ***in vivo* 試験**

購入から 1 週間後、体重 92~106 g のラットを以下の 5 つのグループにランダムに分けた (各 n = 7)。

高脂肪食 (HF) 群	(14% w/w ラード)
HF+Ca-Alg 含有食群①	(14% w/w ラード+2.5% w/w Ca-Alg)
HF+Ca-Alg 含有食群②	(14% w/w ラード+5.0% w/w Ca-Alg)
HF+Ca-Alg 含有食群③	(14% w/w ラード+10.0% w/w Ca-Alg)
HF+RMD 含有食群	(14% w/w ラード+5.0% w/w RMD)

RMD は、TG 排泄を増加させ、腹部脂肪を減少させることが報告されているため、陽性対照群とした (84)。ラットの給餌期間は 5 週間とし、HF 食群の血中 TG 総量が通常食群に比べて有意に増加していることを確認した。この期間中、体重と食餌摂取量を測定し、動物の状態を観察した。7, 14, 21, 28, 35 日後にイソフルラン麻酔しへパリン注射器で 0.5 mL の血液を頸静脈から採取した。これを 1700×g で 10 分間遠心分離して血漿を得た。TG の血漿中濃度を測定し、体組成計を用いて総体脂肪量を測定した。給餌期間の最後の 3 日間に糞を採取した。これを凍結乾燥機で乾燥したのち粉碎し、エタノール中で 70°C, 2 時間加熱した。加熱を 4 回繰り返し、プールした抽出液中の TG 及び胆汁酸を測定した。35 日後、腸間膜脂肪、精巣上体脂肪、後腹膜脂肪組織を取り出し、重量を測定した。

安全性モニタリングのため、35 日以降に採取された血液サンプルが以下の生化学的パラメータの測定に使用された (AST, ALT, PL, NEFA, HDL, LDL, GLU, Ca, Na, K, Cl)。

採血後、放血により動物を安楽死させた (各 n=3)。心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、顎下腺、耳下腺、腸間膜リンパ節、胃、腸、精巣、精巣上体、甲状腺、副腎、白色脂肪組織、褐色脂肪組織を取り出しすぐに 10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定した組織をパラフィンに包埋し 4 μm 厚の切片を作製し HE 染色して顕微鏡で観察した。さらに、HF, RMD, Ca-Alg 10%グループの肝臓切片はオイルレッド O で染色した。得られた染色像は ImageJ を用いて画像解析を行い、オイルレッド O 染色領域を定量した。

### ***in vitro* でのリパーゼ活性阻害試験**

Ca-Alg は水に溶けないため、本実験では Na-Alg を Ca-Alg の代わりに使用した。

Na-Alg 0.3 g を 10 mL の水に溶解、希釈して、1, 5, 15 mg/mL のサンプル溶液を得た。リパーゼ阻害活性は、リパーゼキット S (DS Pharma Biomedical Co.Ltd) を使用し、基質としてジメルカプトプロパノールトリブチレート (dimercaptopropanol tributyrate, BALB) を使用して測定した。50 μL の基質、500 μL の発色試薬、50 μL の 0.5% レンチン / 0.2% 胆汁溶液、および 50 μL のサンプル溶液からなる反応混合物を、30°C で 5 分間プレインキュベートした。蒸留水を陰性対照として使用し、リパーゼ阻害剤であるオルリスタット (0.02 μg/ mL) を陽性対照として使用した。プレインキュベーション後、25 μL のリパ

ーゼを反応混合物に添加し、30°Cで30分間、暗所でインキュベートした。リパーゼ溶液は、クエン酸リン酸緩衝液（pH 7.4）中に25 mUのブタ膵臓リパーゼII型（Sigma-Aldrich）を含み、停止試薬1 mLを加えて酵素反応を停止し、分光光度計 Sunrise Rainbow RC（テカンジャパン株式会社）で412 nmの吸光度を測定した。基質を加える前に停止試薬を加えたことを除いてブランク溶液を同様に調製した。リパーゼ活性（%）は、次の式を使用して計算された。

$$\frac{(\text{サンプル吸光度}) - (\text{サンプルブランク吸光度})}{(\text{コントロール吸光度}) - (\text{コントロールブランク吸光度})} \times 100$$

### 試験管内でのミセルの安定化効果

TG（5 mg）を50°Cで溶解し、レシチン・胆汁混合液（レシチン0.5%、胆汁粉末0.2%）3 mLを攪拌しながら加え、乳化液を調製した。調製した乳濁液にNa-Alg（12 mg/mL, 3 mL）または3 mLの水を加え、その状態を観察した。

### 統計解析

データは平均±標準偏差として表した。Dunnettの検定とWilcoxon検定を使用して統計的比較を行った。p < 0.05 または 0.01 の値は有意であるとみなした。

## 2-3 結果

### アルギン酸塩の消化管内での挙動

模擬胃液で処理したアルギン酸塩はいずれも灰分の大幅な低下が確認された (Fig. 2-1)。アルギン酸の Ca 塩, Na 塩, K 塩すべてにおいて模擬胃液処理後の灰分量は食品添加物公定書 (第 9 版) のアルギン酸の強熱残分 (灰分) 規格: 10.0%以下) を満たすものであった。

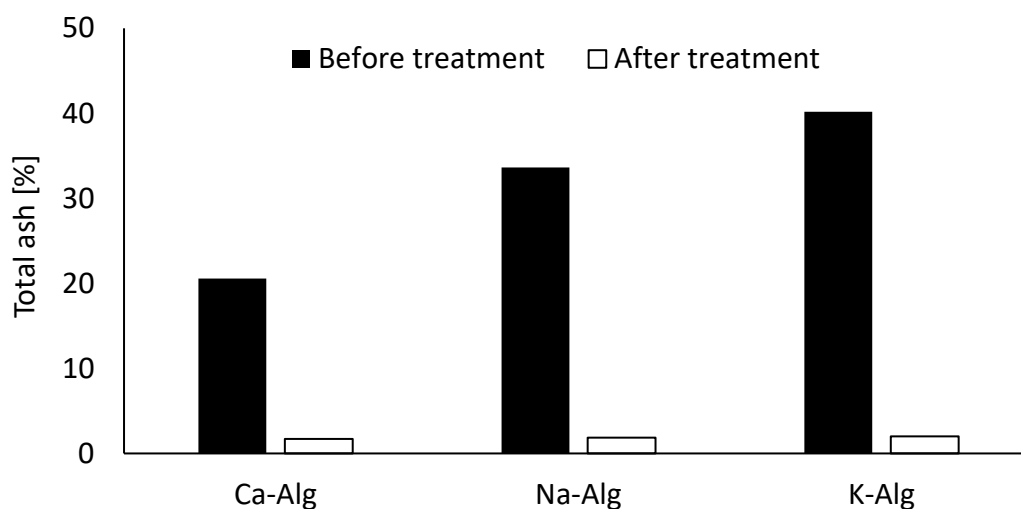


Fig. 2-1 Decrease of total ash in alginate

また、Ca-Alg について、模擬胃液処理時の Ca 含有量を経時的に確認した。模擬胃液に接触して 15 分後には Ca 含有量は初期値の 1/10 程度になっていることが確認された (Fig. 2-2)。

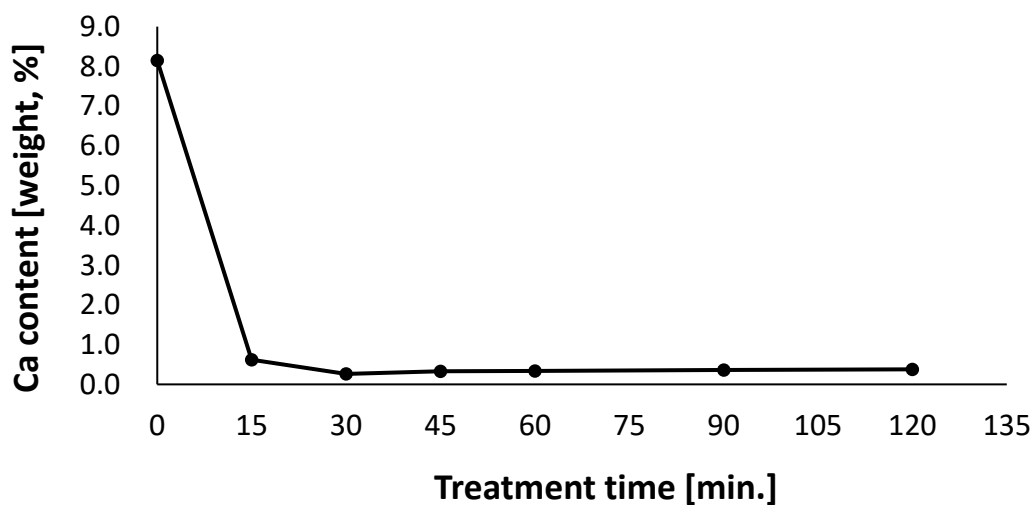


Fig. 2-2 Time-course of alginate coupled Ca content in simulated gastric juice

## 体重への影響

すべてのグループ間で食物摂取量及びカロリー摂取量に有意差は無かった (Table 2-1)。10%Ca-Alg 群では7日目から体重増加が有意に抑制された。

Table 2-1. Cumulative amount of diet and calorie intake and body weight

Parameter	Time (d)	HF	+ Ca-Alg (%)			+ RMD (%)
			2.5	5	10	5
Cumulative amount of diet intake (g/body)	7	92 ± 6	90 ± 9	93 ± 5	92 ± 5	88 ± 4
	14	185 ± 14	179 ± 18	188 ± 11	183 ± 10	179 ± 8
	21	282 ± 27	275 ± 31	288 ± 17	283 ± 21	275 ± 15
	28	392 ± 41	382 ± 47	402 ± 25	393 ± 36	385 ± 23
	35	507 ± 59	496 ± 57	514 ± 32	504 ± 50	495 ± 32
Cumulative amount of calorie intake (kcal/body)	7	413 ± 29	399 ± 39	401 ± 21	382 ± 19	380 ± 17
	14	831 ± 64	787 ± 81	810 ± 48	757 ± 40	771 ± 33
	21	1270 ± 121	1213 ± 135	1242 ± 75	1169 ± 88	1187 ± 64
	28	1766 ± 183	1683 ± 209	1733 ± 108	1624 ± 149	1662 ± 100
	35	2280 ± 266	2184 ± 249	2220 ± 137	2082 ± 206	2134 ± 137
Body weight (g)	0	99 ± 4	98 ± 5	98 ± 4	98 ± 4	98 ± 5
	7	148 ± 8	143 ± 12	143 ± 5	137 ± 7 *	142 ± 7
	14	189 ± 13	180 ± 17	183 ± 9	170 ± 11*	182 ± 9
	21	238 ± 18	228 ± 23	227 ± 14	212 ± 17*	231 ± 14
	28	285 ± 23	269 ± 29	273 ± 18	253 ± 25*	273 ± 19
	35	323 ± 33	304 ± 30	305 ± 20	286 ± 32*	305 ± 20

The data are mean ± S.D. ( $n = 7$ ). The significance of difference between HF group and the Ca-Alg containing groups or the RMD group was determined by means of Dunnett's test (\* $p < 0.05$ ).

## 脂質代謝への影響

血中 TG 濃度は 7 日目に Ca-Alg 10% によって有意に抑制されたが、その後は抑制されなかった (Fig.2-3)。

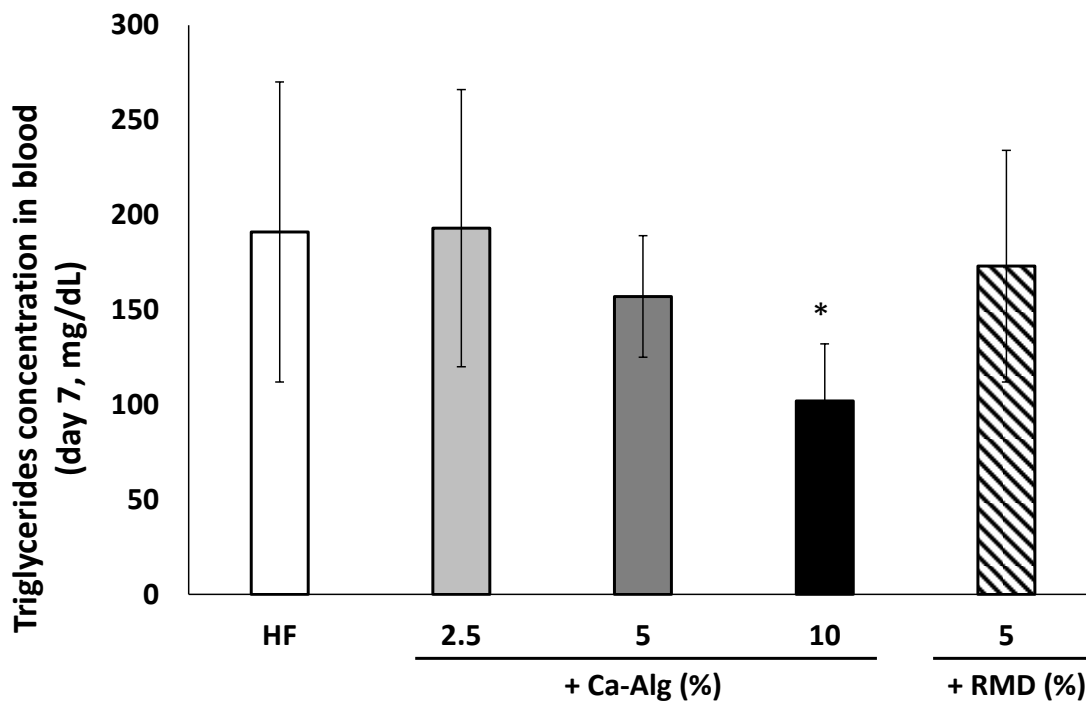


Fig.2-3. Triglycerides concentration in blood at day 7

The significance of difference between HF group and the Ca-Alg containing groups or the RMD group was determined by means of Dunnett's test (\* $p < 0.05$ ).

5 週間後までの TG の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) に関して、5%および 10%Ca-Alg グループで TG 増加に対する有意な抑制効果が観察された (Fig.2-4)。一方、血中コレステロールレベルには有意差は見られなかった。さらに、Ca-Alg は門脈血中の胆汁酸濃度に影響を与えなかった。

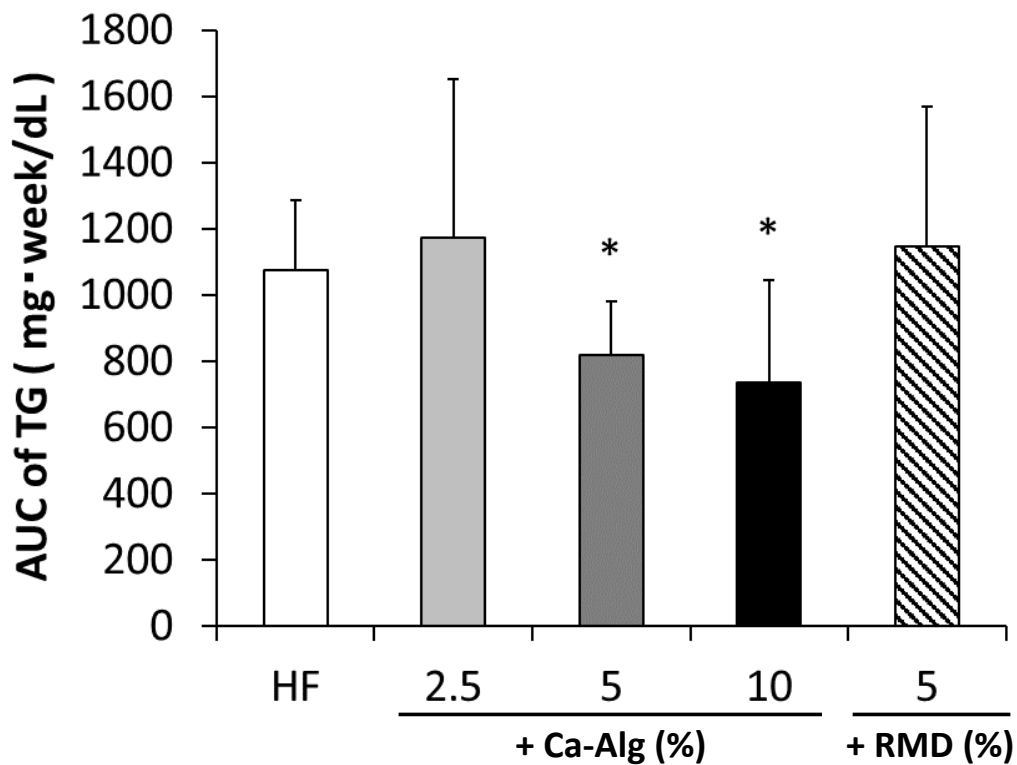


Fig.2-4. Area under the blood concentration–time curve of TG in rats after the five-week feeding period with HF group and Ca-Alg containing groups or the RMD group (\* $p < 0.05$ ).

### 脂肪量への影響

テスト期間中の体脂肪量の増加は次の順であった。

HF > RMD > Ca-Alg 2.5%  $\geq$  Ca-Alg 5% > Ca-Alg 10%

35日目の体脂肪は5%および10%Ca-Algグループで有意に低かった (Fig. 2-5)。35日目に切除された脂肪組織の重量に基づくと、Ca-AlgとRMDは腸間膜脂肪に影響を与えなかった (Fig. 2-6a)。精巣上体脂肪および後腹膜脂肪の増加は、Ca-Alg (5%および10%) およびRMD (Fig. 2-6b および 2-6c) によって有意に抑制された。切除された内臓脂肪の総重量は、コントロールと比較して、RMD、5%および10%Ca-Algグループで有意に減少した (Fig. 2-6d)。



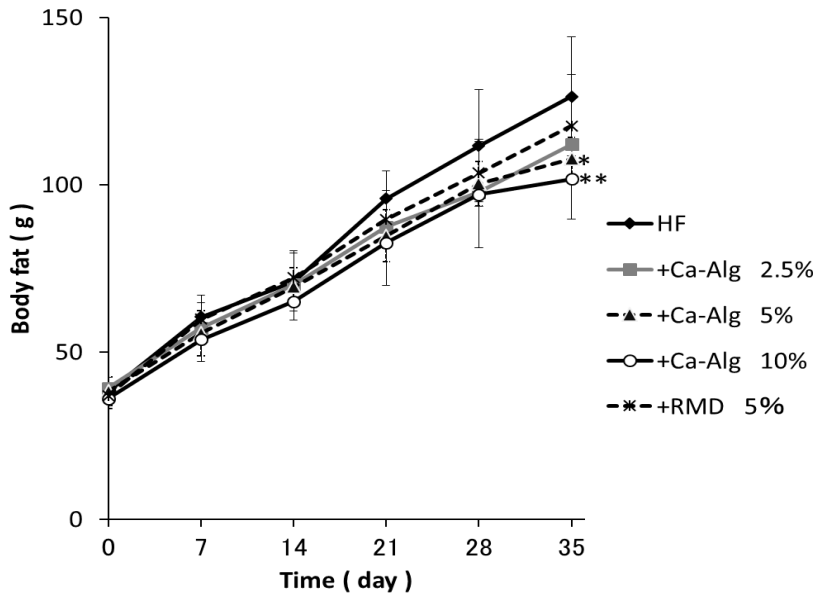


Fig.2-5. Time-course of body fat increase during the experimental period (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

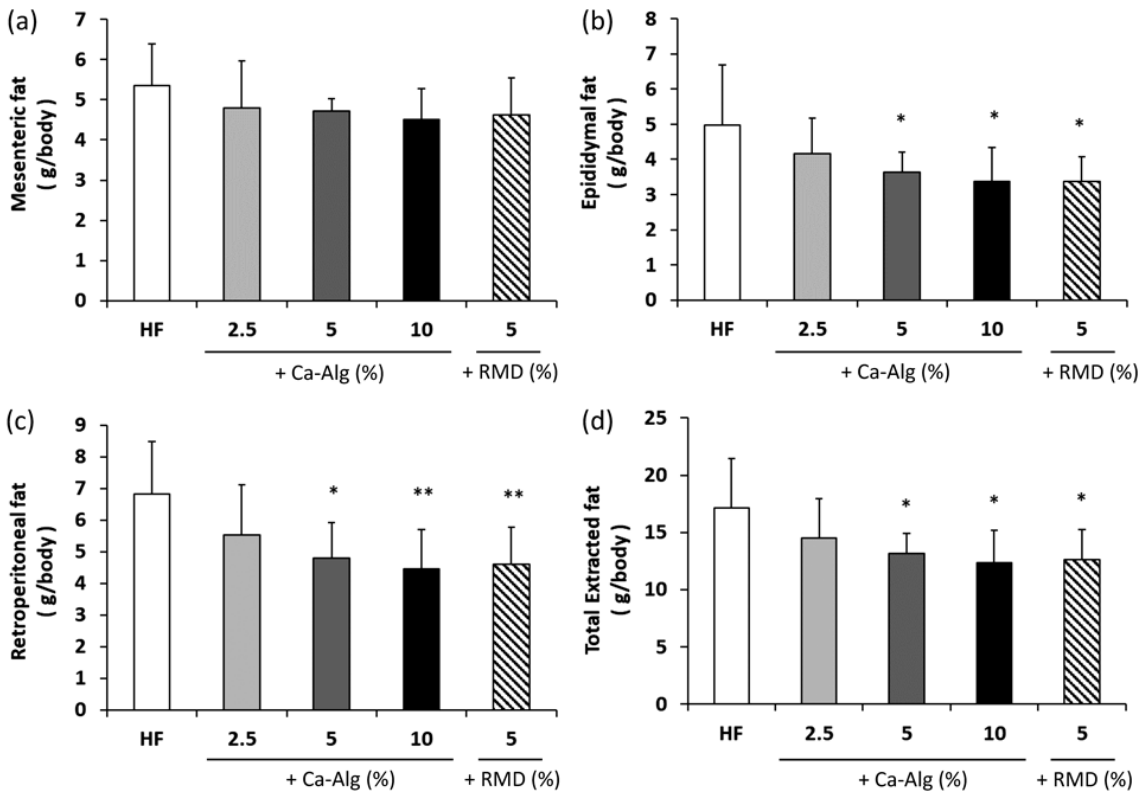


Fig.2-6. Weight of fat tissues after the five-week feeding period with HF group and Ca-Alg containing groups or the RMD group (a) Mesenteric fat, (b) epididymal fat, (c) retroperitoneal fat, (d) total fat ((a) + (b) + (c)). (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 糞への排出

テスト期間中の最後の3日間につき総糞量を測定した。Ca-Algグループでは、糞量の用量依存的な有意な増加が観察された (Fig. 2-7a)。TGの総排泄量を糞中のTG濃度と糞量の積から計算すると、Ca-Alg群でTGの糞中排泄量の濃度依存的な有意な増加が見られた (Fig. 2-7b)。Ca-Algは糞中の胆汁酸排泄には影響を与えなかった (Fig. 2-7c)。

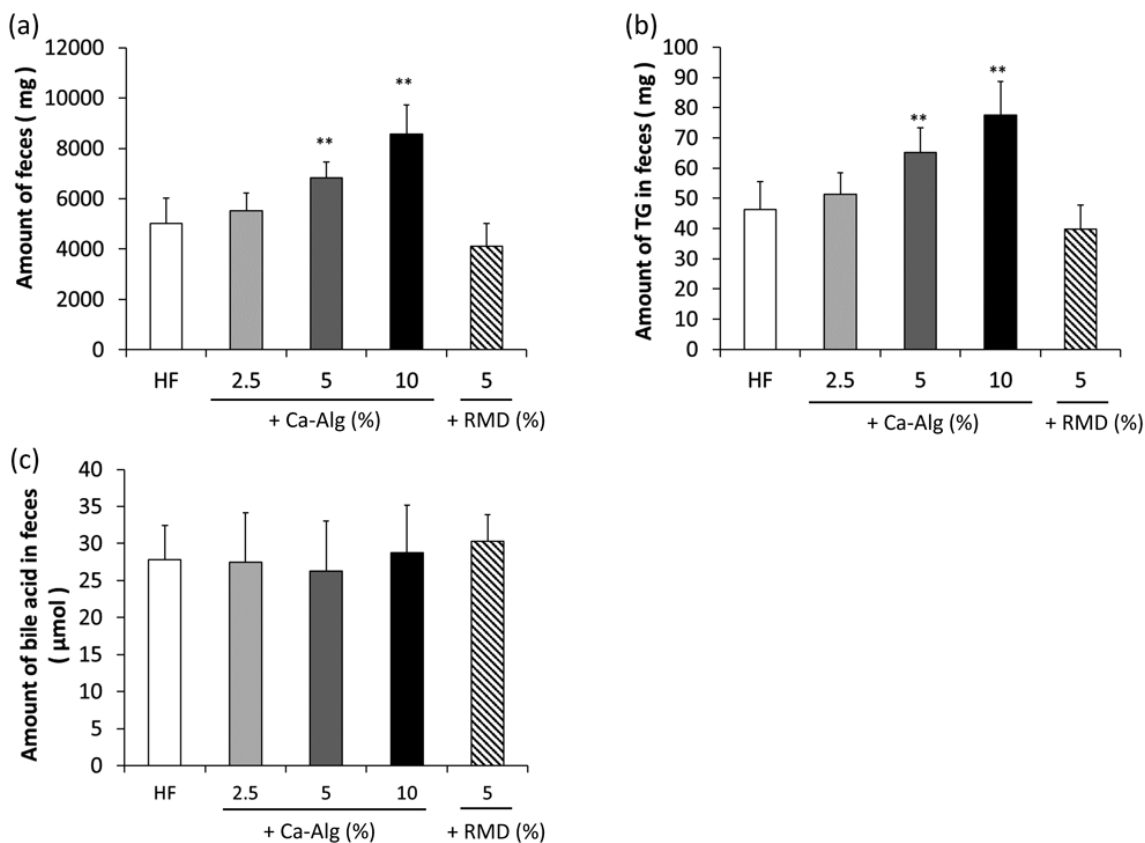


Fig.2-7. Amount of feces, TG and bile acid in rat feces after the five-week feeding period

(a) Amount of feces produced by rats after the five-week feeding period with HF group and Ca-Alg containing groups or the RMD group.

(b) Amount of TG in rat feces after the five-week feeding period with HF group and Ca-Alg containing groups or the RMD group

(c) Amount of bile acid in rat feces after the five-week feeding period with HF group and Ca-Alg containing groups or the RMD group (\*\*p < 0.01).

### 窒素代謝への影響

35日目の血漿中の尿酸、アラントイン、BUNの濃度を測定した。尿酸濃度が低下する傾向があり、Ca-Alg群ではアラントインおよびBUN濃度の用量依存的な有意な低下が観察された (Fig. 2-8)。

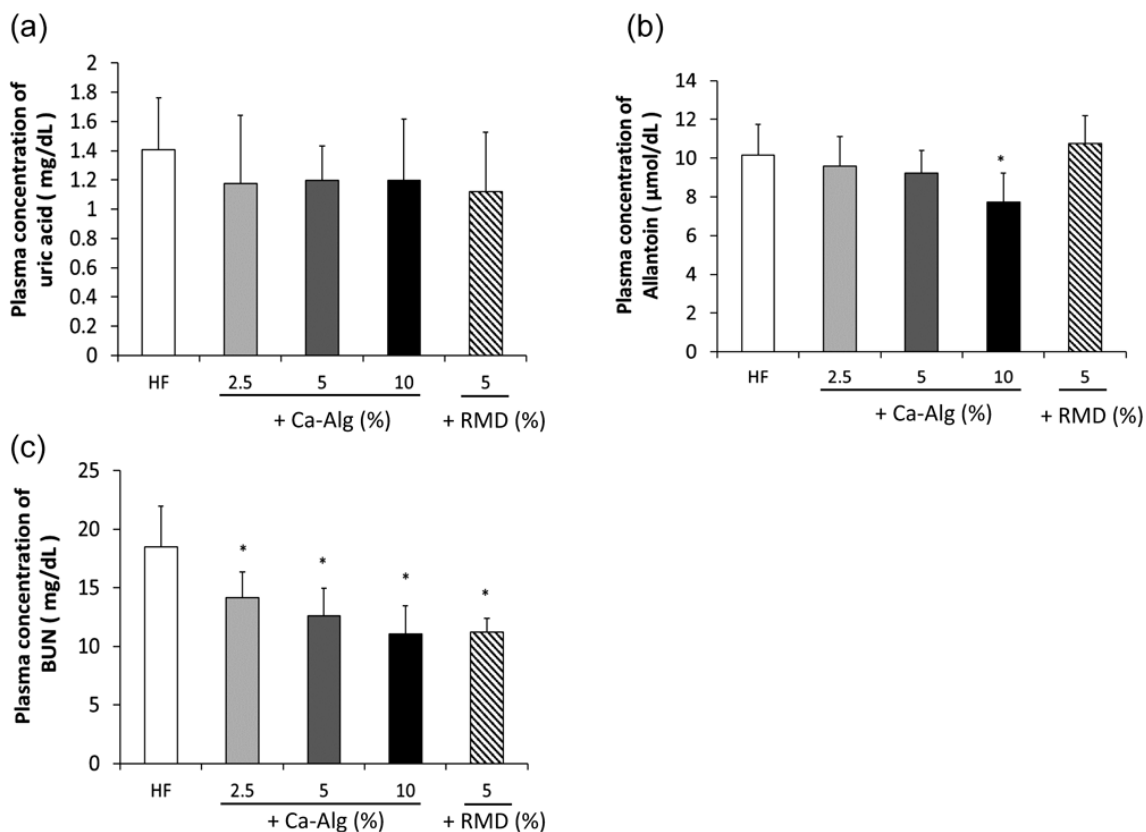


Fig.2-8. Plasma concentrations of (a) uric acid, (b) allantoin and (c) BUN in rats after the five-week feeding period with HF group and Ca-Alg containing groups or the RMD group (\* $p < 0.05$ ).

## 画像所見

肝臓における TG の蓄積を表すと考えられる小胞は、すべてのグループで観察された。また、HF, RMD 5%, Ca-Alg 10%群の肝切片をオイルレッド O 染色し、小胞が脂肪滴であることを確認した (Fig. 2-9)。オイルレッド O 染色領域を ImageJ により定量した。結果は HF での染色領域を 100%として相対比較した。Ca-Alg 10%群の相対オイルレッド O 染色領域は HF 群に比べ有意に低い事が確認された (Fig. 2-10)。

小胞量は HF および RMD グループと比較して 10%Ca-Alg グループで減少した。オイルレッド O 染色の結果はこの結論を裏付けた。すべてのグループ間で他の臓器や組織に違いは観察されなかった。

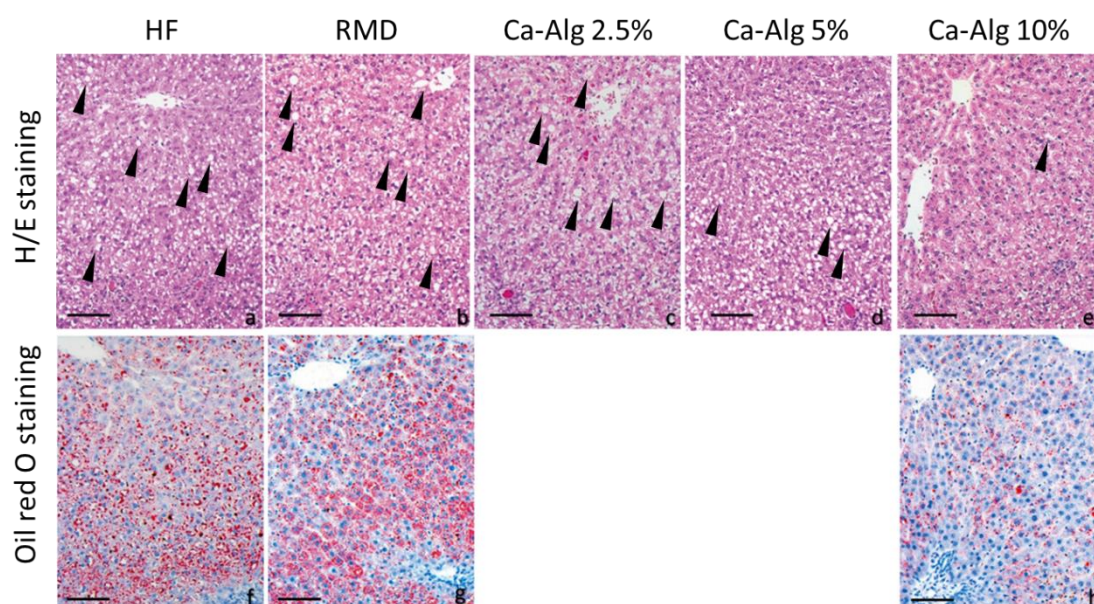


Fig.2-9. Histopathology of hepatocytes from rats given HF group (a and f), RMD group (b and g), 2.5% Ca-Alg containing group (c), 5% Ca-Alg containing group (d), and 10% Ca-Alg containing group (e and h). The results of hematoxylin and eosin staining (a, b, c, d and e) and oil red O staining (f, g and h) show that the decrease of vacuoles in hematoxylin and eosin staining is consistent with the decrease of lipids in hepatocytes. Bar: 100  $\mu$ m.

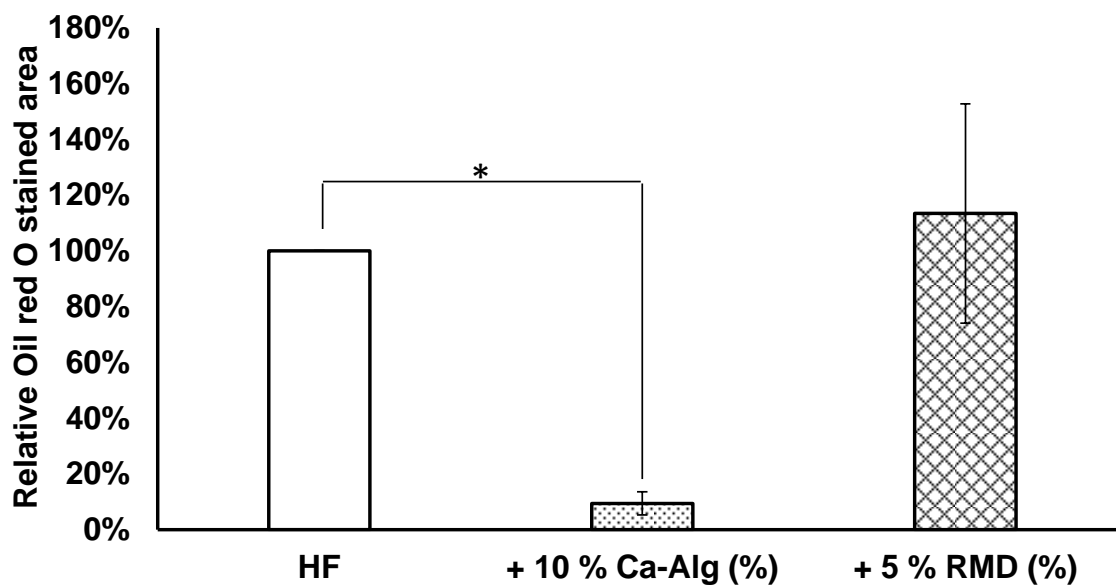


Fig.2-10 Comparison of Oil-red O stained area

The Oil-red O stained area was normalized by the area of HF group (\*p<0.05).

リパーゼ活性阻害作用について (*in vitro*)

Na-Alg によるリパーゼ活性の低下は観察されなかった。一方、リパーゼ活性は、陽性対照として使用されたオルリスタットにより、82.1%まで有意に減少した (Fig. 2-11)。

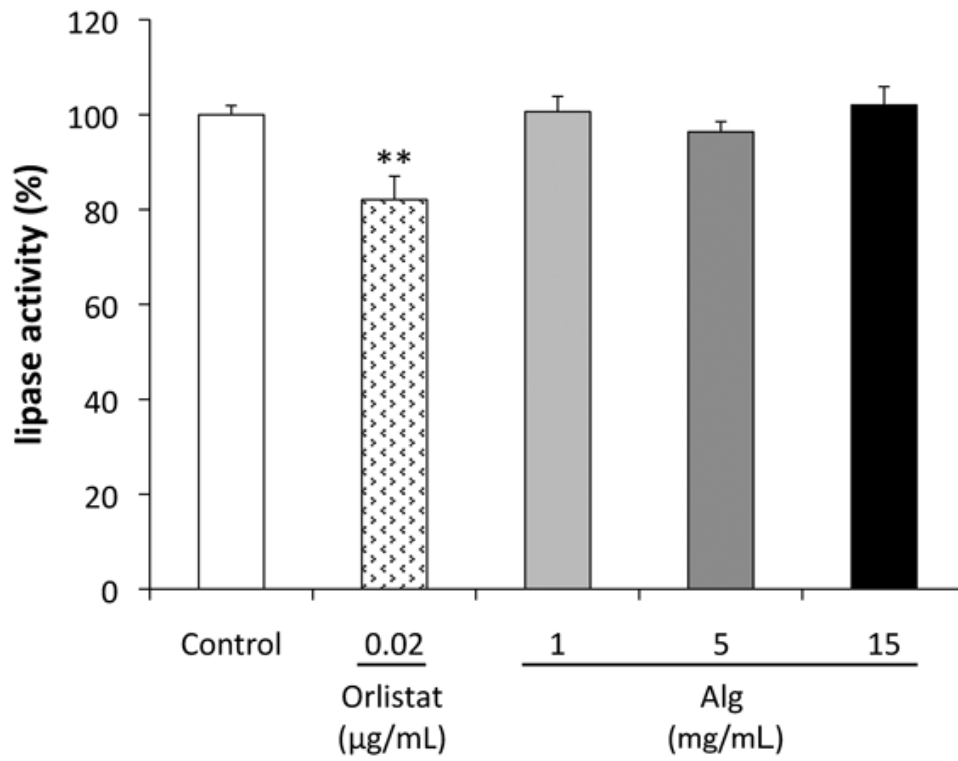


Fig.2-11. Inhibitory effect of Alg on lipase activity (n = 3, \*\*p < 0.01).

### 試験管内でのミセルの安定化効果

- ①： TG、胆汁、レシチンからなる乳濁液
- ②： ①に水を加えると、相分離が発生しレシチンが沈殿、液面にTGが浮上した
- ③： ①に Na-Alg 水溶液を添加すると、相分離は起こらず乳濁液は維持された
- ④： ③を静置すると、5日後にも相分離は起こらずクリーム現象が確認された

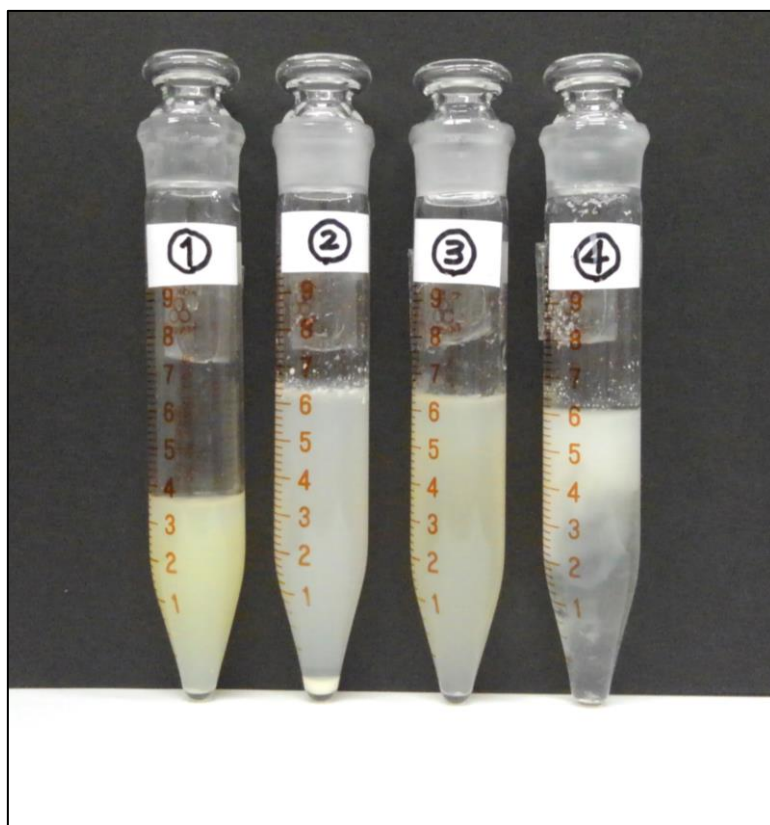


Fig.2-12. Effect of Na-Alg on micelle stability

- ① TG + lecithin + gall, ② TG + lecithin + gall + water, ③ TG + lecithin + gall + Na-Alg, ④ TG + lecithin + gall + Na-Alg (after 5 d).

## 2-4 考察

投与されたアルギン酸塩の消化管内での挙動については、疑似胃液を用いた *in vitro* の実験結果から、投与時の塩の種類 (Ca, Na, K) を問わず胃に滞留する間に遊離酸に変化することが示唆された。Ca-Alg を用いた疑似胃液内での経時変化によると、15 分間で結合していた Ca の約 90% が離脱し遊離酸へと変化している。この結果から、アルギン酸塩は経口投与時の対イオンの種類を問わず、胃内で一旦遊離酸に変化し、小腸へ移送後に小腸のイオン環境に応じて様々なカチオンとの間で複塩を形成するものと考えられる。

脂肪負荷食を与えたラットの TG の吸収と排泄、血中濃度、そして体脂肪、肝脂肪の蓄積に対する Ca-Alg の影響については、Ca-Alg が血中 TG 濃度の AUC を有意に減少させ、体脂肪、肝脂肪の増加を抑制した。同時に、糞への胆汁酸排泄は影響を受けなかったが、排泄される糞の量および TG の量は増加した。

*In vitro* の実験結果から、Alg はリパーゼ活性を直接阻害するのではなく、TG を含む胆汁酸ミセルを安定化することが示唆された。従って Ca-Alg は TG 含有胆汁酸ミセルを吸着し、吸収されにくい大きなミセルを形成するとともに界面でのリパーゼとの接触を阻害し、結果として腸管からの TG 吸収を抑制したと考えられた。

Alg と同じく食物繊維で胆汁酸吸着能を有するキトサンによるリパーゼ活性阻害作用について *in vitro* で調べた報告 (85) では、活性阻害は酵素への直接作用ではなく、乳化に必要な胆汁酸が食物繊維に吸着されたことによる乳化の破壊 (解乳化) の結果リパーゼ活性を阻害したものと推察している。Na-Alg は血中のコレステロールレベルを低下させることが知られており (86, 76)、また次章で詳述する Ca-Alg も同様の作用を示すが (81)、そのメカニズムは、Alg が胆汁酸を吸着してその排泄を促進し、コレステロールから胆汁酸への異化を誘導するためと考えられている。その点からは、Ca-Alg についても同様のメカニズムが考えられるが、今回の実験では胆汁酸の排泄は増加していなかった。また乳化破壊も起こらず、むしろ胆汁酸を含む乳化系でミセルの安定化が観察された。

コレステロール+胆汁酸負荷食を投与した実験では胆汁酸の排泄量が増加した (81) のに対し、本実験では胆汁酸の排泄量が増加しなかったのは、脂肪負荷食を投与された場合には脂肪の乳化に必要な胆汁酸量が増加するが、Alg がそれに優先して胆汁酸を吸着、排泄することはなく、Ca-Alg は胆汁酸が生命にとって不可欠であるため、それらが過剰に存在する場合のみ排泄促進効果を発揮し、胆汁酸濃度が生理的に正常な範囲内、もしくは不足している場合には排泄促進効果を発揮しないのではないかと考えられる。

精巢上体脂肪および後腹膜脂肪の増加は 5% および 10% Ca-Alg 群、および RMD 群で有意に抑制されたが、腸間膜脂肪の増加はいずれの群でも抑制されなかった。ΔHF を個々の群と HF 群との総体脂肪量 (体組成計で測定) の差と定義し、ΔHF を個々の群と HF 群との



間の腸間膜, 精巣上体, 後腹膜脂肪の総重量の差として定義した。総体脂肪量の有意な抑制 ( $\Delta HF$ ) は、Ca-Alg 群でのみ観察された (Table 2-2)。 $\Delta HF'$  は Ca-Alg および RMD 共に有意さが認められた。これらの結果は、Ca-Alg が内臓脂肪のみならず、皮下脂肪を中心とした非内臓脂肪の増加もより強く抑制したことを示しており、RMD よりも脂肪蓄積抑制効果が高いことを示唆している。さらに、Ca-Alg および RMD による脂肪減少の容易さは、精巣上体脂肪および後腹膜脂肪 > 皮下脂肪 (非内臓脂肪) > 腸間膜脂肪の順であった。

Table 2-2. Comparison of decreases of body fat mass and extracted fat amount

	Body fat		Extracted fat	
	Body fat (g)	$\Delta HF$	Total fat †(g)	$\Delta HF'$
HF	126.4 ± 17.8	—	17.1 ± 4.3	—
2.5	112.1 ± 18.5	-14.4	14.5 ± 3.4	-2.6
+Ca-Alg (%)	5	107.8 ± 6.4 *	13.2 ± 1.7 *	-4.0
	10	101.8 ± 12.0 **	12.4 ± 2.8 *	-4.8
+RMD (%)	5	117.7 ± 15.4	12.6 ± 2.7 *	-4.6

† Total fat is summation of mesenteric fat, epididymal fat and retroperitoneal fat. The significance of differences between the HF group and the Ca-Alg containing groups or the RMD group was determined by means of Dunnett's test (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01).

肝臓の病理学的所見からは、TG 蓄積を表すとされる明確な脂肪滴が HF グループに存在しているが、10%Ca-Alg グループでは減少していることが示された。したがって、Ca-Alg は TG の排泄を促進, 吸収を抑制, 肝臓への蓄積を阻害すると判断した。

内臓脂肪量と血中の尿酸濃度との相関が報告されているため、血漿中の尿酸, アラントイン, BUN を測定した(87, 88)。アラントインと BUN は、Ca-Alg グループで有意な用量依存的な減少を示した。ただし、この結果が高脂肪食で飼育された状態に固有のものであるかどうかは不明であり、Ca-Alg が脂肪蓄積のない通常の飼育動物の尿酸代謝に影響するかどうかを調査する必要がある。

グループ間で肝臓重量に有意差は見られなかった。これは Ca-Alg が肝臓に対して毒性を持たなかったことを示している。生化学的パラメータにはいくつかの変化が観察されたが、それらはすべて生理学的に正常な範囲内に留まった。よって Ca-Alg の投与は安全なレベルであったと判断した。

RMD の効果について検証した既報 (84) によると、RMD の単回投与で血中の TG 上昇を抑制したと報告されている。しかし、我々の RMD+HF 食を 5 週間反復投与した実験では、血中 TG レベルは減少しなかった。したがって、Ca-Alg は血中の TG レベルの濃度

を持続的に低下させるが、RMD の効果は一時的なものである可能性があると考えられた。さらに既報と今回の実験結果を比較すると、HF グループの糞中 TG 濃度については同様の結果であったが、既報では RMD 投与により糞重量が増加しているのに対し、本実験では糞重量の増加は見られず、糞中に排泄される TG の量は RMD グループでは増加しなかった。この結果の相違の理由は不明であるが飼料組成の違いに関連している可能性が考えられる。

RMD の作用に関する既報 (84) では、消化吸収を次の二段階 ①digestion process (脂質を遊離脂肪酸とモノグリセロールに加水分解するプロセス) ②absorption process (生成した脂肪酸とモノグリセロールが胆汁酸とリン脂質の作用によりミセルを形成し消化器官を移動し小腸の吸収上皮細胞上でミセルが壊れ脂肪酸とモノグリセロールが放出され吸収されるプロセス) に分け、乳化安定剤としての機能を持つ RMD は後半の②absorption process においてミセルの崩壊を妨げ脂肪酸等の吸収を阻害していると推論している。しかし今回の実験では、Alg については明らかに TG の排泄量が増加しており、TG のリパーゼによる分解は阻害されていると考えられる。一方、RMD で TG 排泄量の増加がなかったのは、既報の仮説の通り TG が脂肪酸とモノグリセリドに分解されるため、TG として計測されなかった可能性も考えられる。

結論として、Ca-Alg は高脂肪食を与えられたラットの血中 TG 濃度と体脂肪の増加を抑制する。また、そのメカニズムとして *in vitro* の実験結果からは、Alg が TG を含む高分子ミセルを安定化することによりリパーゼによる分解から TG を保護するとともにミセルの安定化により腸管からの吸収を阻害している可能性が示唆された。

我々の研究結果から、Ca-Alg は TG の吸収を抑制し、排泄を促進する。その結果、血中 TG レベルを低下させ、肝臓と全身への脂肪蓄積の減少をもたらすことが明らかとなった。

## 第3章

### ラットにおけるアルギン酸カルシウムの血中コレステロール濃度の低下作用

#### 3-1 序

心臓病および脳血管疾患は、日本における全死亡の約4分の1を占めており(89)、それら疾患の主な原因は脂質異常症であると考えられている(90-92)。したがって、コレステロールの吸収を抑制、排泄を促進し、血中コレステロール値を下げる食品添加物や健康食品に大きな関心が寄せられている。

アルギン酸ナトリウム(Na-Alg)は、血中コレステロールを低下させて体重増加を抑制する健康食品として既に使用されている(93-95)。特に低分子化したNa-Algを関与成分とする特定保健用食品は、「血中のコレステロールを改善する」「おなかの調子を整える」という保健機能を表示することが認められ広く流通している(93)。しかしながら、ナトリウムの過剰摂取は高血圧症と関連することが知られており(96)、健康への悪影響が懸念される。もしアルギン酸カルシウム(Ca-Alg)で同様の効果があればNa-Algよりも好ましいと考えられる。また、Algの分子量やウロン酸組成(マンヌロン酸とグルロン酸の比率:M/G比)による効果の差は未だ検討されていない。

本研究においては、最初に粘度(分子量)やM/G比の異なるさまざまな種類のNa-Algについてin vitroでの胆汁酸吸収能力を評価した。その結果、最も吸収能力が高い、グルロン酸含有比率の高い高分子量のAlgを選択し、Ca-Algの高コレステロール食を投与されたラットにおける血中コレステロール濃度低下効果を調べ、高コレステロール血症の治療薬コレステミドと比較した。

## 3-2 実験

### 試薬及び動物

コレステロール、コール酸ナトリウム、コレステロール E-テスト WAKO、総胆汁酸テスト WAKO は、和光純薬工業株式会社製を使用した。[G-<sup>3</sup>H]タウロコール酸は、PerkinElmer Inc. Life Sciences (MA, U.S.A.) 製を使用。各種アルギン酸関連試薬は、すべて株式会社キミカから提供された。高コレステロール血症の治療薬コレスチミドは、田辺三菱製薬株式会社製を使用した。ラット用通常飼料 (CE-2) は、日本クレア株式会社製を使用した。in vivo 試験においてはこれらの食餌にコレステロール、コール酸ナトリウム、Ca-Alg、コレスチミドを各条件の比率で混合して使用した。

他のすべての化学物質と溶剤は分析用グレードの市販製品を使用した。6週齢の雄 Wistar ラットは日本エスエルシー株式会社から購入し、温度 23±3° C、湿度 50±20% に保たれた部屋でケージごとに 2 匹を収容し、明暗サイクルは 12 時間、食餌、水は自由摂食とした。

動物実験は、高崎健康福祉大学の実験動物の取り扱いと使用に関するガイドラインに従って実施され、大学の動物実験倫理委員会による承認を受けて実施された。

### in vitro 試験

2 nM [G-<sup>3</sup>H]タウロコール酸、0.1 μM タウロコール酸ナトリウム、およびさまざまなタイプのアルギン酸 Na (3 mg) を含むリン酸緩衝生理食塩水 1600 μL を室温で 30 分インキュベートした。その後、Amicon Ultra 10k (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて限外濾過 (7500 ×g, 15 分間) した。濾液中のタウロコール酸の量は、液体シンチレーションカウンター (LSC-6100; Aloka, Wallingford, CT, U.S.A.) を使用した放射能測定により決定された。コレステロールについては、ミセル形成およびフィルターへの吸着のためフィルターを通過しなかったため、in vitro 吸収試験は出来なかった。

### in vivo 試験

6 週齢で購入後 1 週間飼育した雄 Wistar ラット (体重 113~152 g) をランダムに以下の 6 群 (各 n = 6) に分けた。

- |                |  |
|----------------|--|
| ①通常食群          | 通常食                                      |
| ②高コレステロール食群    | 0.5% (w/w) コレステロール 0.25% (w/w) コール酸ナトリウム |
| ③Ca-Alg 含有食群-1 | 高コレステロール食+0.5% (w/w) Ca-Alg              |
| ④Ca-Alg 含有食群-2 | 高コレステロール食+1.0% (w/w) Ca-Alg              |
| ⑤Ca-Alg 含有食群-3 | 高コレステロール食+2.0% (w/w) Ca-Alg              |
| ⑥コレスチミド含有食群    | 高コレステロール食+0.5% (w/w) コレスチミド              |

試験食を2週間与えて飼育し、体重と食餌摂取量を測定し状態を観察した。7日後と14日後にジエチルエーテルで麻酔を施し、ヘパリン注射器を用いて、0.5 mLの血液を頸静脈から採取した。これを1700 ×gで10分間遠心分離して血漿を得た。14日後、麻酔下で開腹術後に門脈から0.6 mLの血液を採取し、血漿中のコレステロール濃度を測定した。糞(n=2ラット/ケージ)は、摂食期間の最終24時間に採取した。凍結乾燥機で乾燥した後粉碎し、エタノール中で70°C、2時間加熱した。加熱を4回繰り返し、プールした抽出液中の胆汁酸を測定した。Folch法(97)に従って総脂質の分離と精製を行った。2000 µLのクロロホルム-n-メタノール(2:1, v/v)を100 mgの肝臓を含む5 mLチューブに加えた。サンプルをポリトロンホモジナイザー(Kinematica, Lucerne, Switzerland)でホモジナイズし、4°Cで一晩インキュベートした。KCl 0.8%を400 µL加えボルテックスした後、4°Cで1.5時間インキュベートした。次に、500 µLの下相を真空下で蒸発させた。残留物を500 µLのクロロホルム-n-メタノール(2:1, v/v)と混合し、100 µLを真空下で蒸発させた。残留物を100 µLのイソプロパノールに取り、コレステロール濃度を測定した。

安全性モニタリングのため、35日以降に採取された血液サンプルが以下の生化学的パラメータの測定に使用された(AST, ALT, PL, NEFA, HDL, LDL, GLU, Ca, Na, K, Cl)。

採血後、放血により動物を安楽死させた(各n=3)。心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、顎下腺、耳下腺、腸間膜リンパ節、胃、腸、精巣、精巣上体、甲状腺、副腎、白色脂肪組織、褐色脂肪組織を取り出しすぐに10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定した組織をパラフィンに包埋し4 µm厚の切片を作製しヘマトキシリンとエオシン(Hematoxylin and Eosin, HE)で染色し顕微鏡で観察した。

## 分析方法

生化学的パラメータは、自動分析装置(BioMajesty™JCA-MB6050, 日本電子)と血液検査装置(XT-2000iV, シスメックス)を使用して市販のキットで測定した。DeterminerL TGII BMSは協和メデックス株式会社、Oculusauto CREはShino-Test Corporation、その他の生化学的パラメータの分析キットは和光純薬工業株式会社から購入したものを使用した。

## 統計解析

データは平均±標準偏差として表した。統計的比較は、Dunnett検定とWilliams検定を使用して行った。p<0.05のとき値は有意であるとみなした。

### 3-3 結果

#### In vitro 試験（最適アルギン酸の選定）

Na-Alg が吸収したタウロコール酸の量は、低分子量 Na-Alg より高分子量 Na-Alg の方が多かった。また、高分子量/G-rich の Na-Alg で最も高い吸着率を示した。(Table 3-1)。したがって in vivo 実験では、高分子量/G-rich の Ca-Alg を用いることとした（重量平均分子量： $2.4 \times 10^6$ ，M/G 比 0.38）。

Table 3-1. Comparison of the adsorption capacity of different types of Na-Alg, in terms of adsorption rate of taurocholic acid

		Taurocholic acid adsorption rate
		(% of control)
Control		0.0±26.2
Low MW	M+G	54.8±10.4
	M-rich	-0.1±48.1
	G-rich	26.4±14.4
High MW	M+G	78.7±1.7*
	M-rich	35.6±42.5
	G-rich	82.1±3.5*

The data are mean ± S.D. ( $n=3$ ). The significance of difference from the control was determined by means of Dunnett's test. (\* $p<0.05$ ). We used filters that had adsorbed excess amounts of taurocholate (cold) in advance.

#### アルギン酸カルシウムの血漿コレステロール濃度に対する影響

高コレステロール食を与えたラットの血漿コレステロール濃度は、1週間後にはすべてのグループで増加していた。コレステリドを含む食餌を与えたグループでは、増加の程度は他のグループよりも少なかった。2週間後には、Ca-Alg2%含有食群は、コレステリド含有食群とほぼ同等の減少を示した(Fig. 3-1a)。Ca-Alg 2%含有食群とコレステリド含有食群では、2週間の血漿コレステロール濃度はそれぞれ初期値に対して  $128.5 \pm 14.8\%$  と  $131.4 \pm 19.6\%$  であり、高コレステロール食のみを与えた群（初期値に対して  $161.3 \pm 24.0\%$ ）よりも有意に低かった (Fig. 3-1b)。

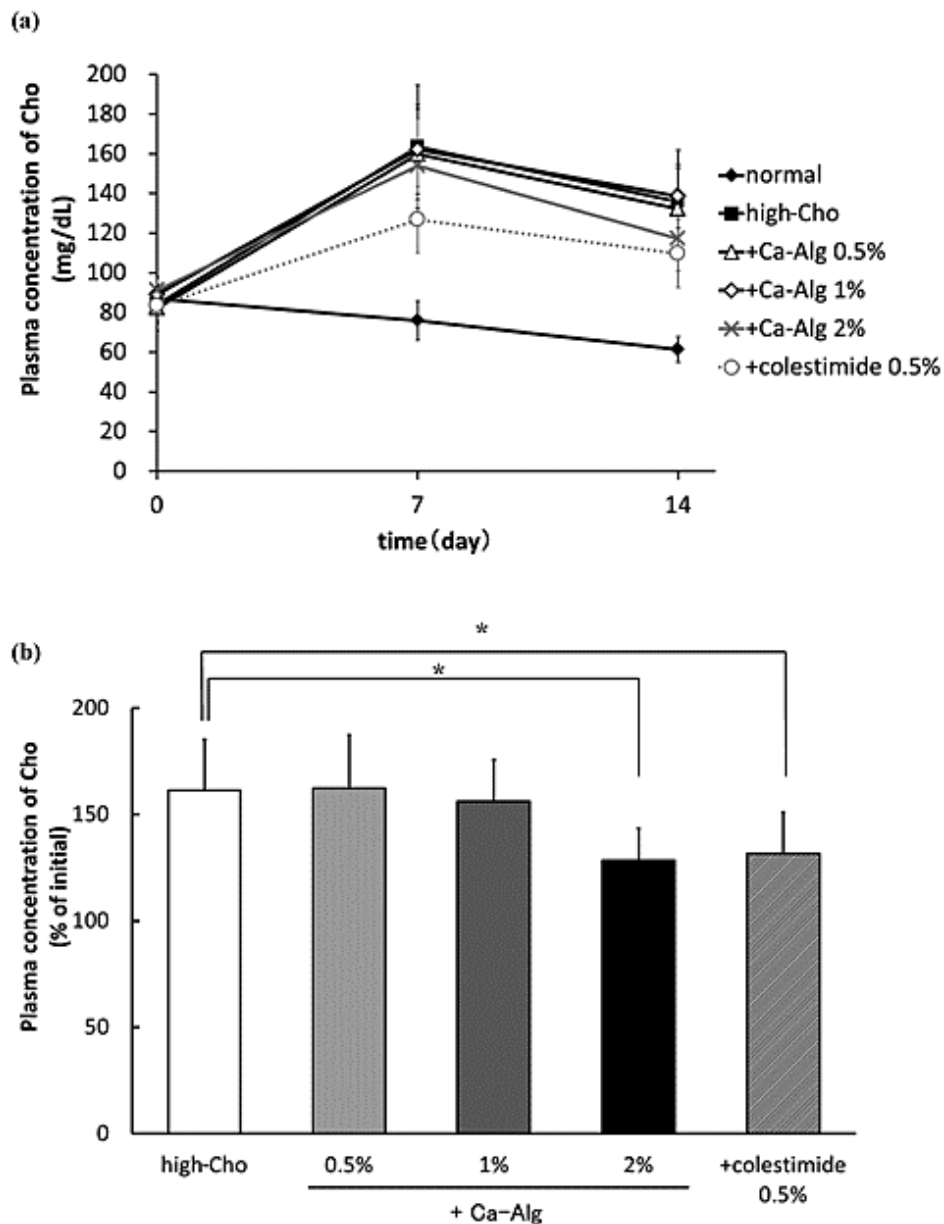


Fig.3-1. (a) Time courses of cholesterol concentration in plasma during the experimental period, and (b) differences between groups at the end of the two-week period rats were fed normal diet, high-Cho diet, or high-Cho diet containing Ca-Alg or colestimide. The data are mean  $\pm$  S.D. (n=6). The significance of differences from the high-Cho diet group was determined by means of Dunnett's test. (\*  $p < 0.05$ ).

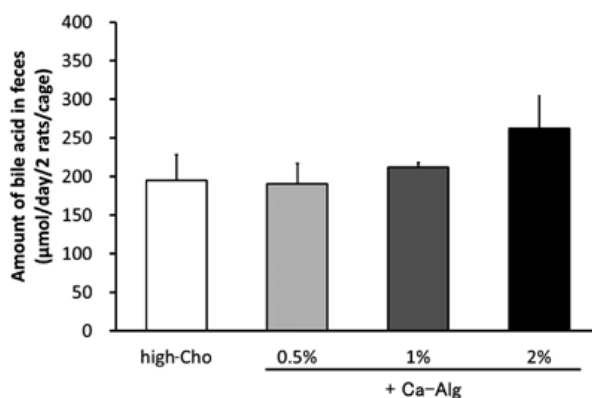
### その他の生化学的パラメータへの影響

1週間後では、コレステリド 0.5%含有食群の血漿中リン脂質 (PL) 濃度は、高コレステロール食群のそれよりも有意に低かったが、2週間後では差は見られなかった。脂質代謝に関連する他の生化学的パラメータの顕著な違いは観察されなかった。心臓, 肝臓, 肺, 腎臓, 脾臓, 顎下腺, 耳下腺, 腸間膜リンパ節, 胃, 腸, 精巣, 精巣上部, 甲状腺, 副腎, 白色脂肪組織, 褐色脂肪組織から作成した組織切片を HE 染色した結果、各組織の病理組織学上の異常は確認されなかった。

### 胆汁酸の糞中への排泄および門脈血漿濃度

糞中への胆汁酸排泄は、食餌中の Ca-Alg 濃度に応じて増加する傾向がみられたが、統計的有意差は確認されなかった (Fig. 3-2a)。2%Ca-Alg 含有食群では、門脈血漿中胆汁酸濃度は、高コレステロール食群 ( $298.7 \pm 77.8 \mu\text{mol/L}$ ) と比較して、 $203.4 \pm 97.0 \mu\text{mol/L}$  と有意に減少した (Fig. 3-2b)。また、門脈血漿中胆汁酸濃度と食餌中の Ca-Alg 濃度に用量依存性は確認されなかった。

(a)



(b)

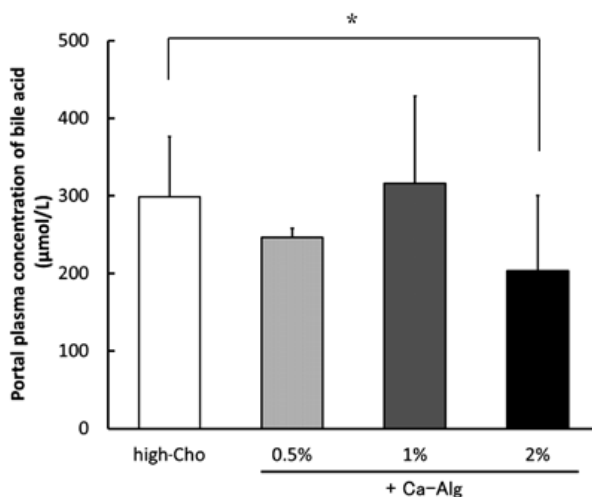




Fig.3-2. (a) Amount of bile acid in feces of rats after two-week feeding period with High-Cho diet or High-Cho diet containing Ca-Alg, (b) Portal plasma concentration of bile acid in rats after two-week feeding period with High-Cho diet or High-Cho diet containing Ca-Alg

(a) The data are mean±S.D. (n=3). Differences were not statistically significant. (b) The data represents mean±S.D. (n=4–6). The significance of differences between the high-Cho diet group and the groups fed high-Cho diet containing Ca-Alg was determined by means of Williams' test. (\* p<0.05).

### 肝臓の重量と肝コレステロール

肝臓の重量増加, 肝臓の総コレステロールについては、高コレステロール食と Ca-Alg 2% 食を給餌したグループ間で違いはなかった (Fig. 3-3)。

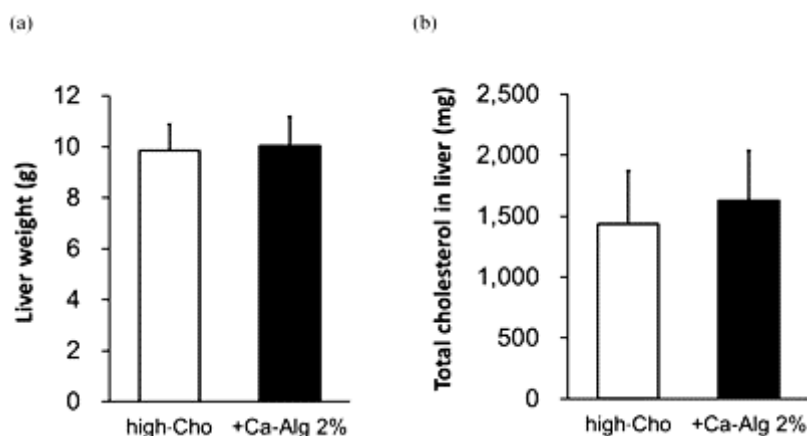


Fig.3-3. Liver weight (a) and total Cho in liver (b) in rats fed the High-Cho diet or the High-Cho diet containing Ca-Alg for two weeks. The data are mean±S.D. (n=6).

### 3-4 考察

アルギン酸塩 (Alg) にはいくつかの種類がある。つまり、 $\beta$ -D-マンヌロン酸の含有比率の高いもの (M-rich)、 $\alpha$ -L-グルロン酸の含有比率の高いもの (G-rich)、またはその中間的なタイプ (M+G) がある。そしてさらに M-rich, G-rich, M+G のそれぞれについて低分子量タイプと高分子量タイプがある。in vivo 実験に最適な Ca-Alg を特定するために、最初に様々なタイプの Alg についてタウロコール酸吸収能力を比較する in vitro 試験を実施した。Ca-Alg は水に溶けないため実験には Na-Alg を使用した。また、コレステロールもフィルターを通過できないため、コレステリドを用いた予備実験に基づいてタウロコール酸塩を選択した。本試験の結果、低分子量タイプより高分子量タイプが、M-rich より G-rich の方が吸収能の高いことが判明した。したがって、in vivo 実験では G-rich 高分子量 Ca-Alg を選択した。

2%Ca-Alg 食餌を2週間ラットに与えた場合、胆汁酸の門脈血漿濃度は有意に低下した。さらに、統計的有意差は確認されなかったものの糞中の胆汁酸量はすべての Ca-Alg グループで増加する傾向があった。したがって、Ca-Alg は胆汁酸に結合し、その腸管の再吸収を阻害することにより、糞中の胆汁酸の排泄を促進する可能性が示唆された。さらに、2週間後の血漿コレステロール値の上昇は、2%Ca-Alg 群では、0.5%コレステリド群と同様のレベルまで有意に低下した。胆汁酸の再吸収の減少が門脈の胆汁酸濃度の低下を引き起こし、それが次に肝臓のコレステロールからの胆汁酸合成の増加を引き起こし、同時に血漿中のコレステロール濃度が低下することが推測される。

腸管から腸へと分泌される胆汁酸の95%が体内に再吸収されることはよく知られており(98, 99)、腸肝循環は体内の胆汁酸の恒常性を維持するための胆汁酸の主要な供給源である。したがって、Ca-Alg による胆汁酸の再吸収の阻害は、血中コレステロールを低下させるための効率的なメカニズムである可能性がある。

グループ間の体重増加、食餌摂取、生物学的パラメータに有意差は確認されなかった。さらに、肝臓の総コレステロール量または肝臓の重量に変化はなかった。生化学的パラメータと組織病理学的所見のいくつかの変化が観察されたが、すべての値は生理学的に正常とみなされる範囲内に留まった。さらに、すべてのグループにおいて動物は外見上の明らかな異常を示さなかった。これらの結果は、Ca-Alg を2%のレベルで2週間毎日摂取しても安全であることを示している。LDL と HDL は、両方ともテスト期間中上下に変動したため、Ca-Alg 投与によってどのタイプのリポタンパク質が減少したかまでは推定できなかった。この点については更なる実験検討が必要である。

結論として本研究は、食餌中の2%Ca-Alg が高コレステロール食ラットの血漿中コレステロールの増加を抑制することを示した。考えられるメカニズムは、腸管からの再吸収の減

少による胆汁酸の糞中排泄の増加であり、これが次に肝臓におけるコレステロールからの胆汁酸合成を刺激し、血漿コレステロールの減少につながった可能性がある。この研究では、食餌に 2%Ca-Alg 添加が効果的であることが示された。また Alg は、低分子量より高分子量、M-rich より G-rich の方が胆汁酸の吸収能力の高いことがわかった。Ca-Alg は、Na-Alg とは異なり、水に不溶性であり粘性がないため服用しやすい。さらに、Ca-Alg は食品添加物として安全に使用できることが確認されており、ナトリウム摂取量の増加による高血圧のリスクはない。したがって、高分子量で G-rich の Ca-Alg は、現在特定保健用食品として広く流通している低分子化 Na-Alg よりも優れた機能と安全性を有しているものと考えられた。

## 第 4 章

### ラットにおけるアルギン酸カルシウムのストロンチウム (Sr), セシウム (Cs) 吸収抑制効果と排泄促進効果

#### 4-1 序

2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災の後、福島第一原子力発電所で発生した事故により放射性物質が大気中に放出された。これらの物質、特に放射性ストロンチウム ( $^{90}\text{Sr}$ , 半減期=28.8 年) とセシウム ( $^{137}\text{Cs}$ , 半減期=30.17 年) による汚染は、半減期が長いこと公衆衛生上の重大な問題となった (100, 101)。昨今はこれらの放射性物質の体内への吸収を減らし、排泄を促進する可能性のある医薬品や食品への関心が高まっている。しかし新規物質の安全性の確立には時間がかかるため、すでに安全性評価の確立している天然物や食品に注目が集まり、いくつかの有望な結果が報告されている (102-104)。

Sr の投与前にアルギン酸ナトリウム (Na-Alg) を摂取した場合、人体へのストロンチウム (Sr) の蓄積が 1/8 に減少したことがすでに報告されている (109)。また、Na-Alg を 10 日間事前摂餌させたラットに放射性 Sr ( $^{85}\text{Sr}$ , 半減期=64.8 d) を投与した場合、体内の  $^{85}\text{Sr}$  の蓄積量は、対照群と比較して著しく少なく、この効果は Na-Alg の前投与期間が長くなるほど大きい。そして、Na-Alg を 10 g/body/day 摂取することによって放射線損傷を低減し保護することが可能であると報告されている (98)。国際原子力機関 (IAEA) は、大量の放射性 Sr に被曝した患者の治療に Na-Alg を 4 g/body/day 服用することを推奨している (110)。

しかしながら、これらの研究では高血圧を引き起こす可能性のあるナトリウム塩のみが研究の対象であった。この観点において、過剰摂取が常態化しているナトリウム塩に替えて、欠乏が懸念されるカルシウム塩 (アルギン酸カルシウム: Ca-Alg) に同等またはそれ以上の効果があれば、Na-Alg よりもはるかに有用である。Na-Alg の水溶液をカルシウムイオンを含む水溶液と接触させると瞬時にカルシウムイオンによってアルギン酸分子鎖がイオン架橋されゲルが形成される。ゲルネットワーク構造を有する Ca-Alg は、金属の取り込みや吸着の点で、Na-Alg より有利である可能性がある。

本研究では、ラットの Sr と Cs の吸収と排泄に対する Na-Alg と Ca-Alg の影響を調べて比較した。また両者の安全性についても検討した。

## 4-2 実験

### 試薬及び動物

塩化ストロンチウム ( $\text{SrCl}_2$ ) と塩化セシウム ( $\text{CsCl}$ ) は和光純薬工業から購入使用した。他のすべての化学物質と溶剤は分析グレードの市販製品を使用した。

5 または 6 週齢の特定病原体を含まない雄 Wistar ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、制御条件 (温度  $23\pm 3^\circ\text{C}$ , 湿度  $50\pm 20\%$ ) に保たれた動物室でケージごとに 2 匹を収容した。明暗サイクルは 12 時間とした。Na-Alg (重量平均分子量:  $2.1\times 10^6$ , M/G 比 0.39) および Ca-Alg (重量平均分子量:  $2.4\times 10^6$ , M/G 比 0.38) は、株式会社キミカから提供された。通常のラット食餌 (CA-1) および前記の食餌に 10% (w/w) の Na-Alg または Ca-Alg を含む食餌は、日本クレア株式会社から提供された。

動物実験は、すべて高崎健康福祉大学の実験動物の取り扱いと使用に関するガイドラインに従い、同大学の動物実験倫理委員会による承認を受けて実施された。

### in vitro での吸着試験

濃度 0 (コントロール), 0.25, 1, 2.5, および 5 mg/mL の Na-Alg 溶液を調製し、最終濃度 0.2 mg/mL となるように  $\text{SrCl}_2$  または  $\text{CsCl}$  を添加した (即ち 1.26 mM  $\text{SrCl}_2$  および 1.19 mM  $\text{CsCl}$ )。同じ最終濃度 0.2 mg/mL の  $\text{CsCl}$  と  $\text{SrCl}_2$  の混合物も使用した。これらの溶液を、メンブレンフィルター (Amicon ウルトラ 3K デバイス, 3000NMWL, メルク ミリポア) を利用して限外濾過 (15,000  $\times\text{g}$ , 20 分) した。濾液中に回収された Sr と Cs の量は、原子吸光光度計 (ContrAA 700, Analytik Jena AG) を使用してグラファイトフューネス法で測定した。実験は 2 回行われ、Sr と Cs の濃度はコントロールに対する比率として示し  $\text{EC}_{50}$  値を計算した。Ca-Alg は水不溶性のため本実験は行わなかった。

### ラットにおける Sr 及び Cs の排泄促進試験

購入から 1 週間後、体重 (153~180 g) のラットを無作為に対照群、10%Na-Alg 含有食群、および 10% Ca-Alg 含有食群 (各  $n=5$ ) に分けた。ジエチルエーテルで麻酔をかけた後、ヘパリン注射器で頸静脈から血液サンプルを採取し、これを 1,700  $\times\text{g}$  で 10 分間遠心分離して血漿を得た。次に、血漿中の天然 Sr または Cs の初期濃度を測定した。通常の食餌、Na-Alg を含む食餌、または Ca-Alg を含む食餌は、2 週間各ラットに個別に自由摂食させ、水は自由に与えた。7 日後と 14 日後、血液サンプルを採取して、Sr と Cs の血漿中濃度を測定した。

### ラットにおける Sr 及び Cs の吸収抑制試験

購入後 1 週間で、体重 (153~174 g) のラットを 6 群 (各 n=5) に無作為に分けた。各群に以下の食餌を 2 週間個別に与えた。

群 1 及び 4 : 通常食

群 2 及び 5 : 10%Na-Alg 含有食

群 3 及び 6 : 10%Ca-Alg 含有食

次に、群 1, 2, 3 には SrCl<sub>2</sub>添加蒸留水 (1 mg / 5 mL / kg)、群 4, 5, 6 には CsCl 添加蒸留水 (2 mg / 5 mL / kg) を経口投与した。血液サンプルを指定された時間に採取し、Sr または Cs の血漿濃度を測定した。最大血漿中濃度 (C<sub>max</sub>)、C<sub>max</sub> までの時間 (T<sub>max</sub>)、および吸収速度定数 (ka) は、投与前の値を差し引いた観測データから決定した。0~3 時間の血漿濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-3hr</sub>) は、台形法によって推定した。

### 安全性評価

購入後 1 週間のラット (体重 209~232g) を同様に 3 群 (各 n = 5) にランダムに分け、3 種類の食餌を個別に 2 週間与えた。体重と食餌摂取量を測定し、この期間中に動物の状態を観察した。その後放血により動物を安楽死させた (各 n=3)。心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、顎下腺、耳下腺、腸間膜リンパ節、胃、腸、精巣、精巣上部、甲状腺、副腎、白色脂肪組織、褐色脂肪組織を取り出しすぐに 10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定した組織をパラフィンに包埋し 4 μm 厚の切片を作製して HE 染色し顕微鏡で観察した。

### 統計解析

データは平均±標準偏差として表した。Dunnett 検定と Williams 検定を使用して統計的比較を行った。p < 0.05 の場合有意であると見なした。

### 4-3 結果

#### 試験管内での吸着試験

Sr のみの添加群では濃度依存的に Na-Alg に吸着され、濾液中の Sr の回収率は、Na-Alg 濃度 1~5 mg/mL で対照の 11% 未満であった (Fig. 4-1)。EC<sub>50</sub> 値は  $0.296 \pm 0.001$  mg/mL であった。Cs のみの添加群も濃度依存的に Na-Alg に吸着され、ろ液中の Cs 回収率は、2.5 および 5.0 mg/mL の Na-Alg 濃度で検出限界 ( $1.0 \times 10^{-4}$ %) 未満であった。Cs の Na-Alg の EC<sub>50</sub> 値は  $0.211 \pm 0.002$  mg/mL であった。

一方、Sr と Cs の混合物を使用した場合、Na-Alg による Cs の吸着は Cs 単独の場合よりも少ないのに対し、Na-Alg による Sr の吸着は Sr 単独の場合と同じであった。Sr および Cs の EC<sub>50</sub> 値は、それぞれ  $0.308 \pm 0.002$  mg/mL および  $1.073 \pm 0.003$  mg/mL であった。

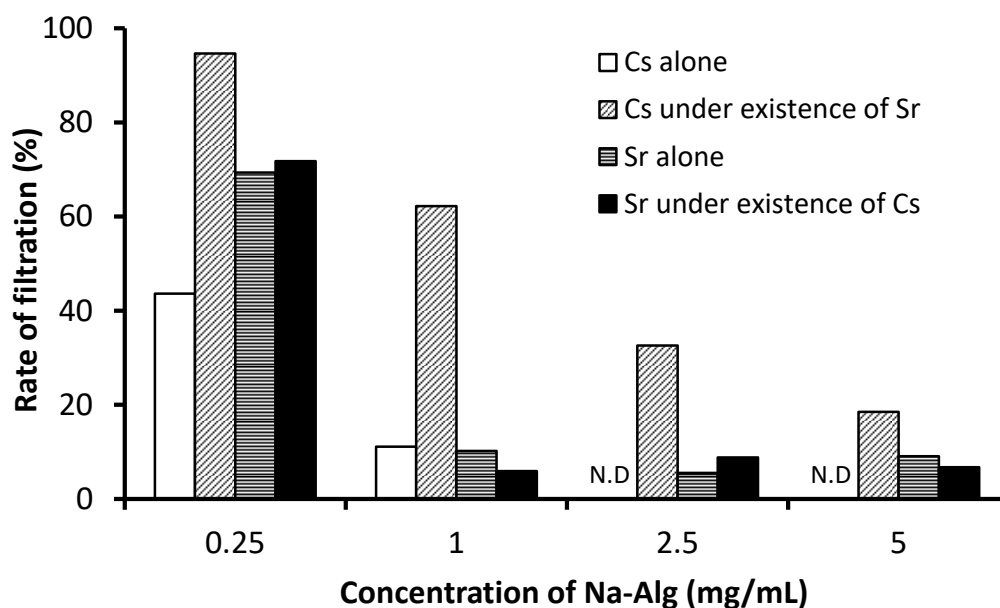


Fig.4-1. Recovery ratios of Sr and Cs in filtrate from solutions containing various concentrations of Na-Alg

The bars represent the mean recovery of Sr or Cs as percent of the amount added (n=2).  
N. D.: Not detected (less than  $1.0 \times 10^{-4}$  % of the amount added).

### ラットにおける Sr および Cs の排泄促進作用

Sr の初期血漿濃度は、6 週齢のラットで  $301.8 \pm 45.5$  ng/mL であった。Na-Alg と Ca-Alg を給餌したグループでは、Sr 濃度は、対照グループと比較して、1 週間でそれぞれ 65%、63%、2 週間で 77%、66% と有意に減少した (Fig. 4-2)。

一方、Cs の初期血漿濃度は 6 週齢のラットで  $118.8 \pm 30.7$  ng/mL であり、これは Ca-Alg でのみ有意に減少した (コントロールの 60% まで)。Na-Alg 群では有意な変化は見られなかった (Fig. 4-3)。

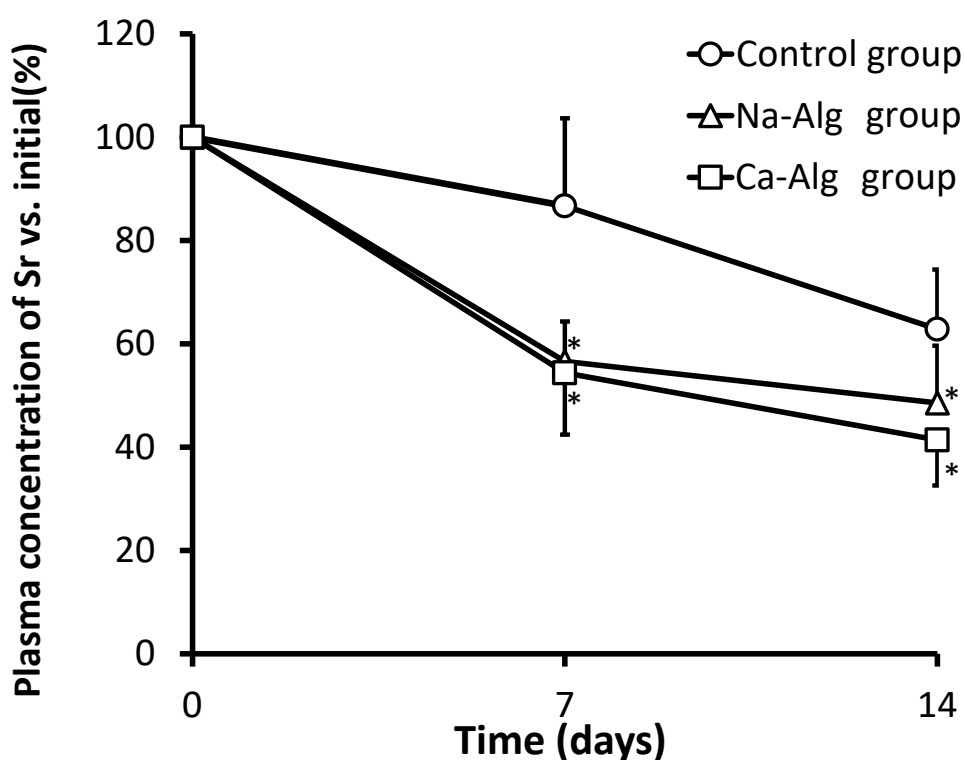


Fig.4-2. Plasma concentration of Sr in rats during two-week feeding with normal diet, Na-Alg-containing diet or Ca-Alg-containing diet

The data represent means $\pm$ S.D. (n=5). The significance of differences between the control group and Na-Alg or Ca-Alg group was determined by ANOVA with post hoc test (\*p<0.05).



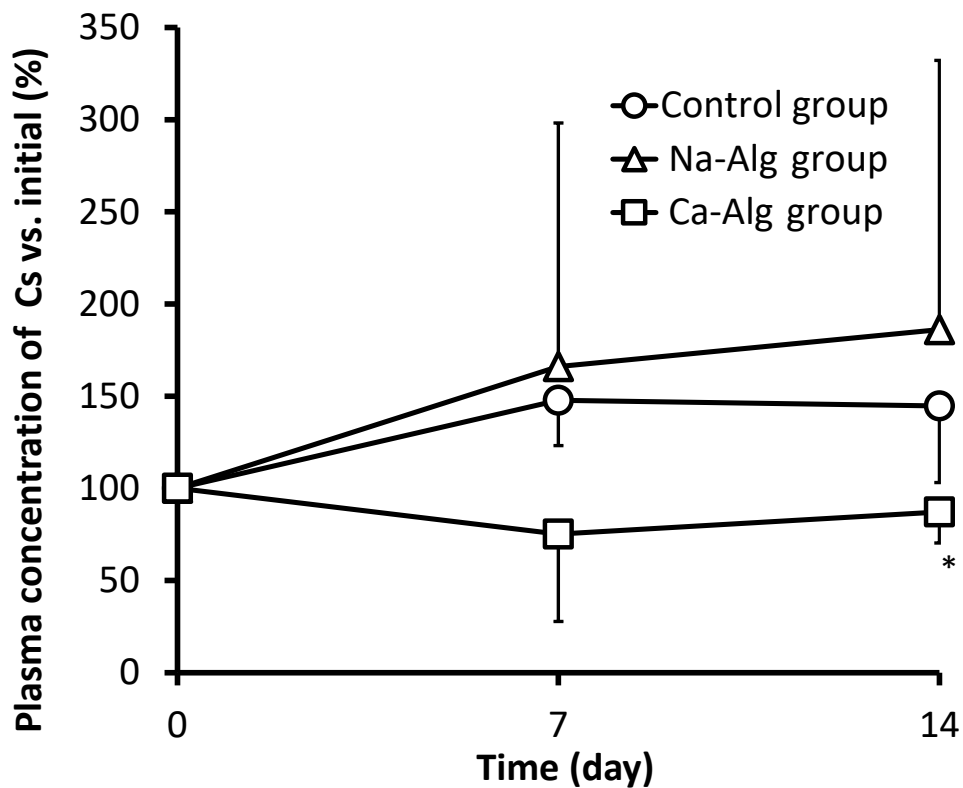


Fig.4-3. Plasma concentration of Cs in rats during two-week feeding with normal diet, Na-Alg-containing diet or Ca-Alg-containing diet

The data represent means  $\pm$  S.D. (n=5). The significance of differences between the control group and Na-Alg or Ca-Alg group was determined by ANOVA with post hoc test (\*p<0.05).

#### ラットにおける Sr および Cs の吸収に対する影響

SrCl<sub>2</sub>溶液がコントロール群 (Na-Alg, Ca-Alg 未摂取群) に経口投与された場合、Sr の血漿濃度は投与後 0.6 $\pm$ 0.2 時間で最大値 108 $\pm$ 43 ng/mL に達した。k<sub>a</sub> は 4.7 $\pm$ 0.8 $\times$ 10<sup>-3</sup> hr<sup>-1</sup> で、AUC<sub>0-3hr</sub> は 80 $\pm$ 37 ng $\cdot$ hr/mL であった。

Na-Alg グループと Ca-Alg グループでは、Sr の吸収が大幅に減少した。Na-Alg グループでは、C<sub>max</sub> は 0.9 $\pm$ 1.2 時間で 58 $\pm$ 34 ng/mL、k<sub>a</sub> は 4.1 $\pm$ 3.5 $\times$ 10<sup>-3</sup> hr<sup>-1</sup>、AUC<sub>0-3hr</sub> は 33 $\pm$ 16 ng $\cdot$ hr/mL であった。Ca-Alg 群では、C<sub>max</sub> は投与後 1.6 $\pm$ 0.9 時間で 37 $\pm$ 13 ng/mL、k<sub>a</sub> および AUC<sub>0-3hr</sub> はそれぞれ 1.9 $\pm$ 3.5 $\times$ 10<sup>-3</sup> hr<sup>-1</sup> および 24 $\pm$ 9 ng $\cdot$ hr/mL であった (Fig. 4-4, Table 4-1)。

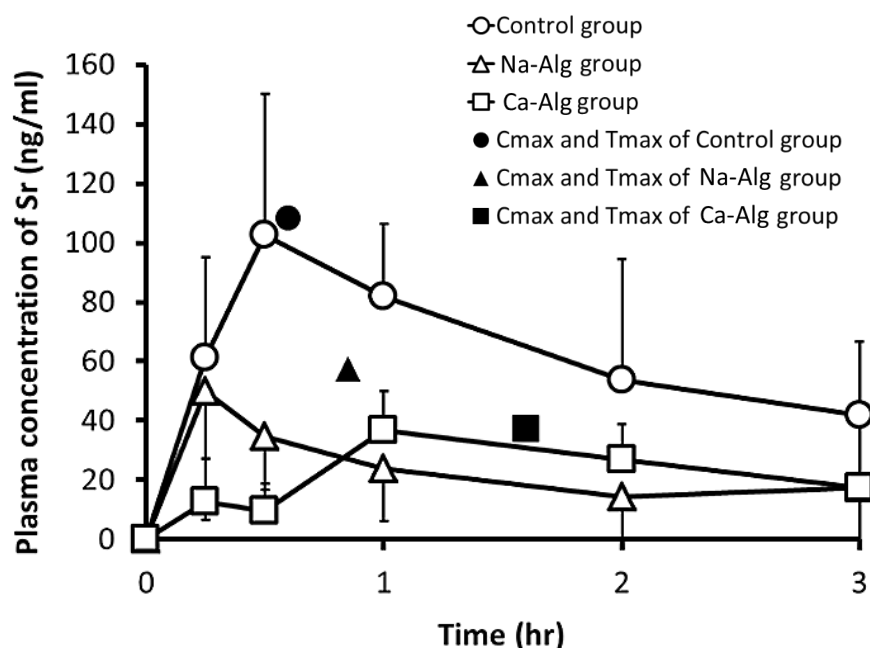


Fig.4-4. Plasma concentration of Sr after oral administration of SrCl<sub>2</sub> to rats  
The data represent means±S.D. (n=5).

Table 4-1. Pharmacokinetic parameters of Sr plasma concentration after oral administration of SrCl<sub>2</sub> to rats

Parameter \ Group	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (hr)	k <sub>a</sub> (× 10 <sup>-3</sup> hr <sup>-1</sup> )	AUC <sub>0-3hr</sub> (ng·hr/mL)
Control	108 ± 43	0.6 ± 0.2	4.7 ± 0.8	80 ± 37
Na-Alg	58 ± 34 *	0.9 ± 1.2	4.1 ± 3.5	33 ± 16 *
Ca-Alg	37 ± 13 *	1.6 ± 0.9	1.9 ± 3.5 *	24 ± 9 *

The significance of difference between the control group and Na-Alg or Ca-Alg group was determined by using ANOVA with post hoc test (\*p<0.05).

CsCl 溶液がコントロール群に経口投与された場合、Cs の血漿濃度は 0.3±0.0 時間で最大値 233±39 ng/mL に達し、 $k_a$  は  $6.0 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$  で  $AUC_{0-3\text{hr}}$  は  $401 \pm 57 \text{ ng} \cdot \text{hr}/\text{mL}$  であった。コントロール群と Na-Alg 群の間の Cs 血漿濃度プロファイルの有意差は観察されなかった。Ca-Alg 群では、 $C_{\text{max}}$  と  $AUC_{0-3\text{hr}}$  の両方が、コントロールグループの値よりも有意に低い値を示した (Fig. 4-5, Table 4-2)。

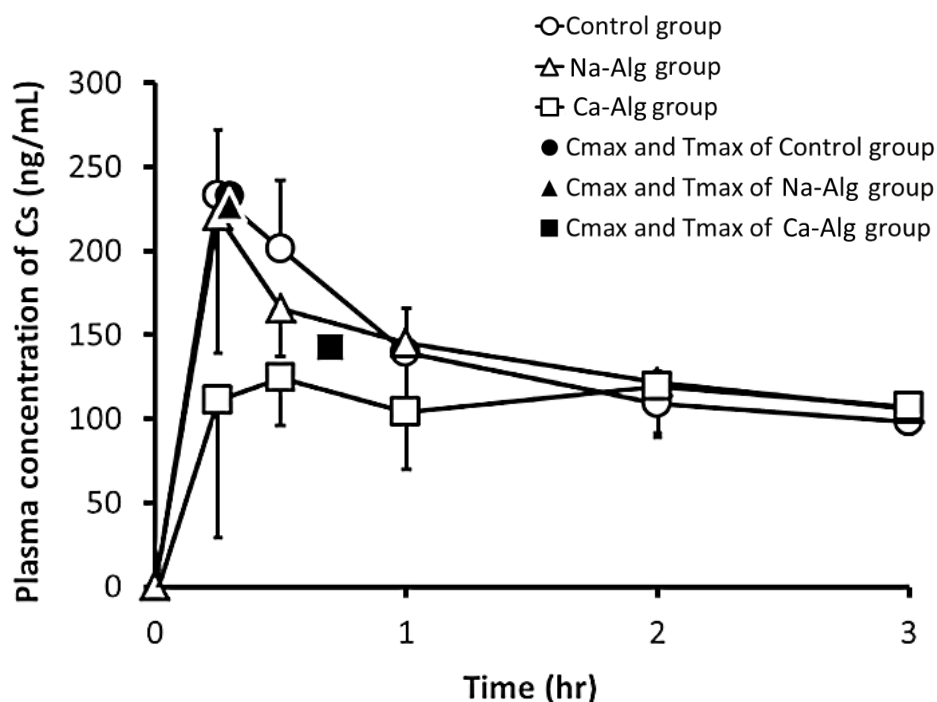


Fig.4-5. Plasma concentration of Cs after oral administration of CsCl to rats  
The data represent means±S.D. (n=5).

Table 4-2. Pharmacokinetic parameters of Sr plasma concentration after oral administration of CsCl<sub>2</sub> to Rats

Parameter \ Group	$C_{\text{max}}$ (ng/mL)	$T_{\text{max}}$ (hr)	$k_a$ ( $\times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ )	$AUC_{0-3\text{hr}}$ (ng·hr/mL)
Control	233 ± 39	0.3 ± 0.0	6.0 ± 0.3	401 ± 57
Na-Alg	227 ± 72	0.3 ± 0.1	5.9 ± 0.5	401 ± 83
Ca-Alg	142 ± 13 *	0.7 ± 0.7	5.1 ± 0.4	301 ± 52 *

The significance of difference between the control group and Na-Alg or Ca-Alg group was determined by using ANOVA with post hoc test (\* $p < 0.05$ ).

## 安全性評価

2 週間の摂食期間中、3 つの群の間で体重増加の差は観察されなかった (Fig. 4-6a)。ただし、Ca-Alg 群の食餌摂取量は、他の 2 つの群の食餌摂取量よりも約 10% 多かった (Fig. 4-6b)。いずれの群においても一般的な生理学的状態の変化は観察されなかった。

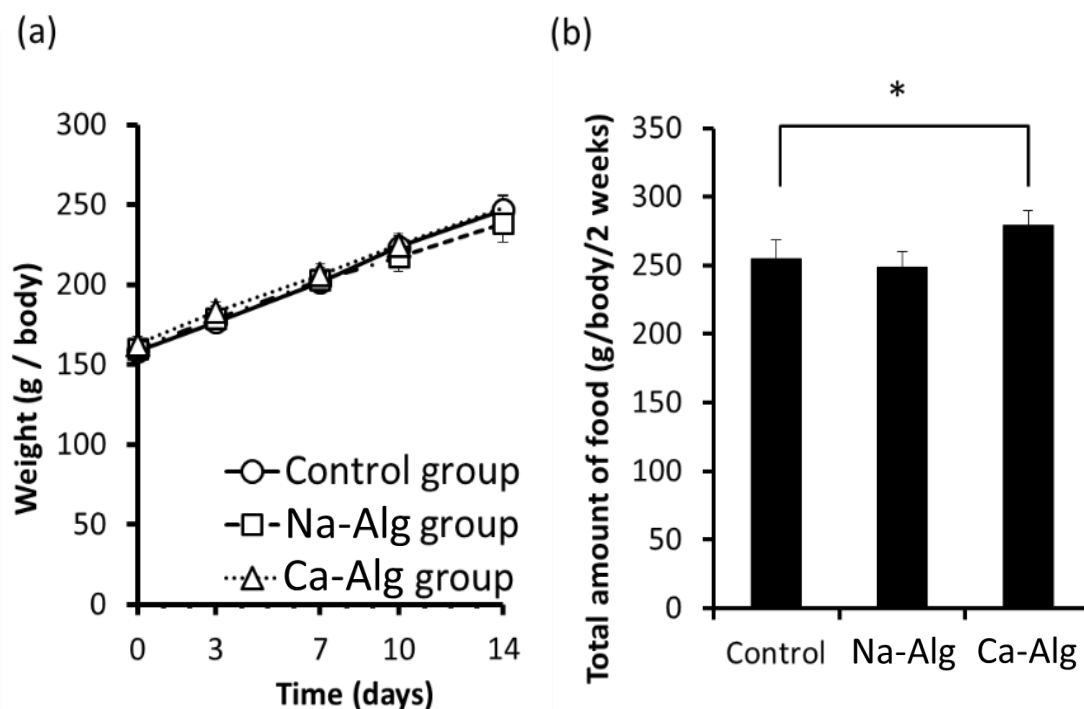


Fig.4-6. Weight gain (a) and diet intake (b) during two-week feeding period

Normal diet, Na-Alg-containing diet or Ca-Alg-containing diet was individually given to rats for two weeks. The data represent means $\pm$ S.D. (n=5). The significance of differences between the control group and Na-Alg or Ca-Alg group was determined by ANOVA with post hoc test (\* $p$ <0.05).

1 週間後、Ca-Alg 群の血漿中のコレステロール濃度はコントロールよりも有意に低かったが、2 週間後では 3 つの群間でコレステロール濃度の有意差は観察されなかった。PL, HDL, LDL についても同様の傾向が見られた。一方でコントロール群の血漿中の TG は時間とともに増加したが、Ca-Alg 群の TG 増加は 2 週間後では有意に低かった。これは、Na-Alg 群でも同様の傾向であった。同様の傾向が NEFA の血漿濃度で観察された (Fig. 4-7a ~f)。しかし、3 つの群の間で他の生化学的パラメータの有意差は観察されなかった。

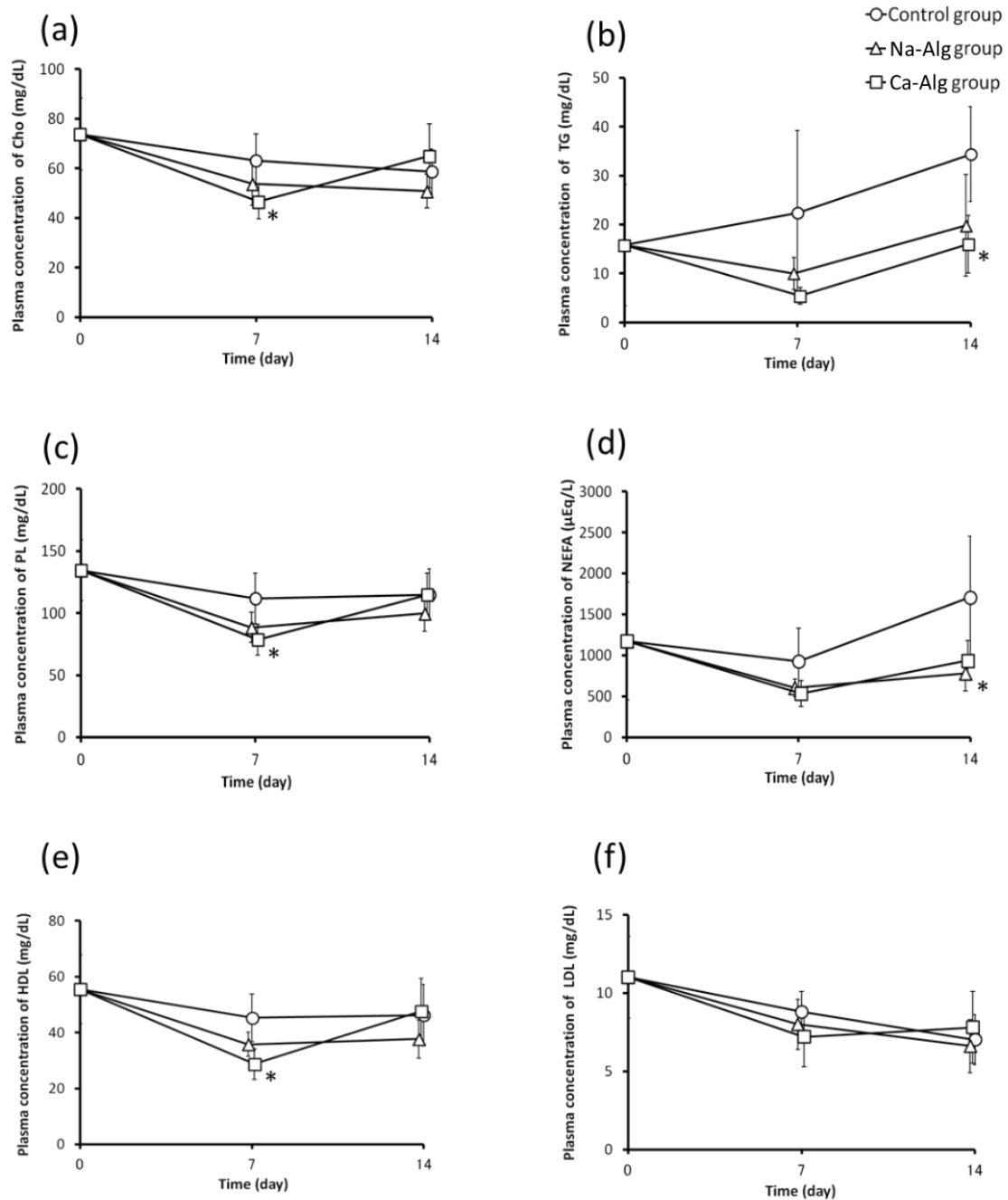


Fig.4-7. Changes of biochemical parameters in rat plasma during two-week feeding period

Plasma concentrations of Cho (a), TG (b), PL (c), NEFA (d), HDL (e) and LDL (f) were measured. The data represent means±S.D. (n=5). The significance of differences between the control group and Na-Alg or Ca-Alg group was determined by ANOVA with post hoc test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

組織病理学的観察により、Na-Alg 群の腎臓の腎盤上皮におけるミネラル沈着が明らかになった。沈着物の周囲に上皮過形成が観察された。ミネラル沈着は、腎髄質または腎乳頭上皮にも見られた (Fig. 4-8, Table 4-4)。その他の臓器には異常は見られなかった。コントロール群および Ca-Alg 群の動物に明らかな異常は観察されなかった。

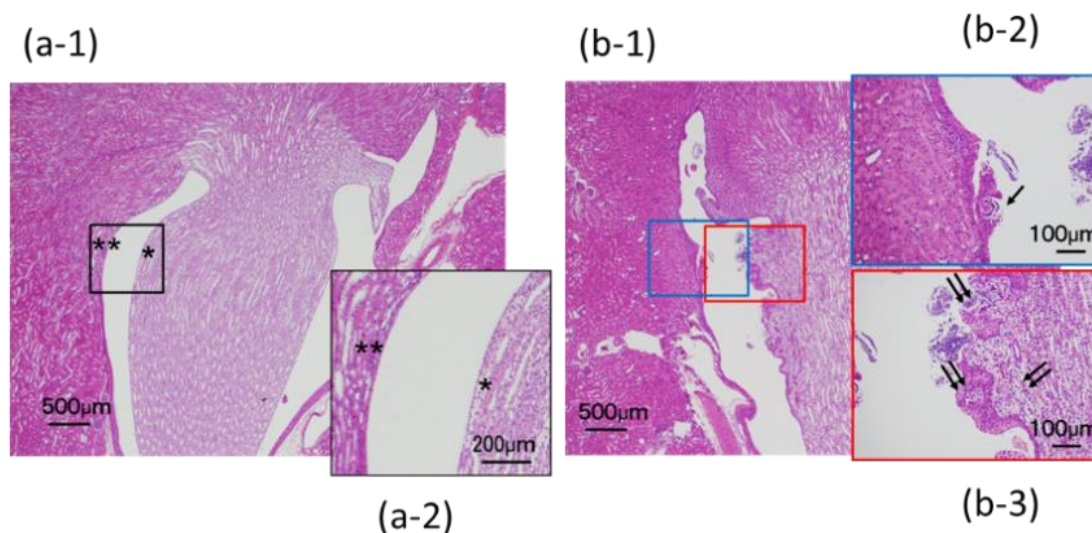


Fig.4-8. Representative histochemistry of rat kidneys after a two-week feeding period with normal diet (a-1,2) and Na-Alg-containing diet (b-1,3)

Fig. 4-8(a-2) is enlargements of Fig. 4-8(a-1) black frames. Fig. 4-8(b-2) and 4-8(b-3) are enlargements of Fig. 4-8(b-1) red and blue frames, respectively. No abnormalities were seen in the epithelium of papilla (\*) or pelvis (\*\*) in kidneys of rats given normal diet. Mineral deposition was seen in pelvic (↓) and papillary epithelium (↓↓) in kidneys of rats given Na-Alg-containing diet. Hyperplasia or proliferation of transitional cells can be seen around the deposits.

Table 4-4. Histopathological findings in rat kidneys after two-week feeding of normal diet, Na-Alg containing diet and Ca-Alg containing diet

Findings	Control			Na-Alg			Ca-Alg			
	No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mineral deposition in medulla	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Mineral deposition in pelvic epithelium with inflammatory cell infiltration	-	-	-	++	+	±	-	-	-	-
Mineral deposition in papillary epithelium with inflammatory cell infiltration	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Proliferation of transitional cells in papilla	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hyperplasia of pelvic epithelial cells	-	-	-	++	+	±	-	-	-	-

Grade of changes: - : within normal limits, ± : slight, + : moderate, ++ : severe

#### 4-4 考察

in vivo 実験の結果、Ca-Alg が Sr と Cs の排泄を促進し吸収を抑制するのに効果的であることがわかった。Cs と Sr の排泄促進のメカニズムは、Alg が難消化性の食物繊維であるため、血液から消化管へ排出される Cs と Sr の再吸収を阻害して糞とともに体外へ排泄させるものと推定された。一方、Na-Alg は Sr に対して同様の効果があったが、Cs の場合には効果が見られなかった。

in vitro での吸着試験の結果によると、Na-Alg は、Sr と Cs の両方に対して各々吸着能を有しているが、Cs の吸着効果は Sr の共存下では大きく減少した。しかし Sr 吸着効果は Cs の共存下でも妨げられなかった。

Alg は 2 種類のウロン酸、すなわち  $\beta$ -D-マンヌロン酸と  $\alpha$ -L-グルロン酸が共重合した高分子電解質であり、これらのウロン酸のカルボキシル基と金属イオンとの間にはイオン結合が形成される。そして金属イオンが 2 価以上の場合には速やかに高分子鎖間でのイオン架橋が起こり Egg-Box Junction を形成して安定化するとともに三次元ゲルマトリックス構造を形成する (1 1 1)。Na と Cs は一価のカチオンであるのに対し、Ca と Sr は二価のカチオンであり、Ca と Sr は Alg 分子間でキレートを形成して安定化できるが、Na, Cs はキレートを形成することができない。

また、Na, Ca, Sr, Cs のイオン半径は、それぞれ 95, 99, 113, 169 pm である (1 1 2)。この 4 種類の金属イオンの中では、Cs のみが際立ってイオン半径が大きく、したがって表面電荷密度も低いことから、Alg のカルボキシアニオンサイトを、より小さな Na, Ca, Sr イオンでは容易に利用できるが、大きな Cs イオンでは利用しにくい可能性があると考えられる。

そもそも Ca-Alg が網目状の三次元マトリックス構造を有していたことにより、胃酸による攻撃を受けた後も緩やかな網目構造を維持し、Sr や Cs の物理的な取り込みに適した形状となっている可能性が考えられる。

Sr と Cs の排泄と吸収に対する Alg の挙動は、身体に不可欠な微量元素に対して同様の影響を及ぼす可能性がある。このため Alg の安全性についても調査した。ナトリウムの過剰摂取によるミネラルの沈着は Na-Alg グループの腎臓上皮で見られた。Ca-Alg 群では異常は全く検出されなかった。これらの結果から、Ca-Alg は Na-Alg よりも安全であることがわかった。

結論として Alg、特に Ca-Alg は、Sr と Cs の吸収抑制と排泄促進とに効果的であり、IAEA が推奨する Na-Alg よりも効果と安全性の両面ですぐれていることが示された。従って、放射性物質の放出を伴う核事故後の有効な保護剤となる可能性がある。実用化するために、Ca-Alg の適切な投与量を設定する臨床試験が必要である。

## 第 5 章

### 総括

本研究では、ラットを用いて Ca-Alg のもつ機能性、特に脂質異常症に関連する中性脂肪とコレステロールの代謝への影響を調べ、さらに放射性物質による環境汚染対策としての Sr, Cs 吸収阻害と体外排泄について実験検討を加えた。

### 実験結果のまとめと考察

高脂肪食を与えられたラットの血中 TG 濃度と体脂肪の増加は、Ca-Alg により有意に抑制された。その効果は、既に TG 排泄、脂肪減少効果が報告されており陽性対照として実験系に加えた RMD を上回る結果であった。メカニズムとしては、消化管内で Alg が TG を含む高分子ミセルを形成することによりリパーゼによる分解から TG を保護する可能性が示唆された。結果として、Ca-Alg が血中 TG レベルを低下させ、肝臓および全身への脂肪蓄積の減少をもたらしていることが明らかとなった。

Alg によるリパーゼの活性調節機能について *in vitro* で調べた報告 (113) によると、リパーゼの活性阻害作用は、Alg の種類により左右され、G-rich タイプは M-rich タイプより阻害能はるかに高く、分子量は決定要因ではないと結論づけている。そして、Alg が油/水界面に作用してリパーゼが界面にアクセスする機会を減らす可能性が高いと推察している。

また、Alg とムチン(Mucin)の水性混合物は、弱い粘弾性ゲルを形成することが報告されている (114)。Alg はムチンのタンパク部分の特定部位と相互作用し、いくつかのムチン分子を架橋してゲルを形成することができる。その相互作用には Alg 中の G-ブロックが大きく関与している可能性が高い。したがって G-rich タイプが M-rich タイプより阻害作用が強いことと符合する。消化器官表面の粘膜はすべて粘液糖たんぱく質ムチンに覆われており、アルギン酸含有ミセルは粘膜表面で Alg-ムチン複合ゲルを形成し、リパーゼの攻撃から保護される、もしくは分解されたモノグリセロール等を小腸上皮細胞から吸収されにくくすることも考えられる。

Alg とムチンとの相互作用については、今までほとんど検討されていない。Na-Alg は、消化管、特に胃粘膜の保護作用があり、内服薬として国内外で広く利用されている。従来この作用は胃酸による Alg のゲル化に起因するものとされてきた。消化管に限らず粘膜表面を覆うムチンと Alg のゲル形成能については、脂質の吸収のみならず、われわれが既に報告した食後血糖値の上昇抑制 (115) や粘膜保護作用などのメカニズムにも深く関わっている可能性があり、今後詳細に追究してゆくべきテーマであると思われる。

RMD による脂肪吸収抑制効果について報告した既報 (116) によると、脂質の消化吸収を、①リパーゼが TG を分解する Digestion Process と、②分解産物の脂肪酸、モノグリ



セロールが吸収される Absorption Process に分け、RMD では②の Absorption Process においてミセルの安定化により吸収を阻害していると推論されている。しかし Ca-Alg では、TG 排泄の有意な増加が確認されており、①の Digestion Process でリパーゼによる TG の分解が阻害されていることが明らかである。一方で、体脂肪の増加抑制量( $\Delta$ HF) については、10%Ca-Alg 群で HF 群に対し平均 24.7 g/35 days に対して、糞中へ排泄された TG の増加量は、Fig.2-7 (b) より約 30 mg/3 days(約 350 mg/35 days)と、用量依存性と有意差はあるものの量的には極めて少ない。したがって、Ca-Alg においても②Absorption Process におけるミセルの安定化による吸収阻害が働いているものと推測される (Fig. 5-1)。

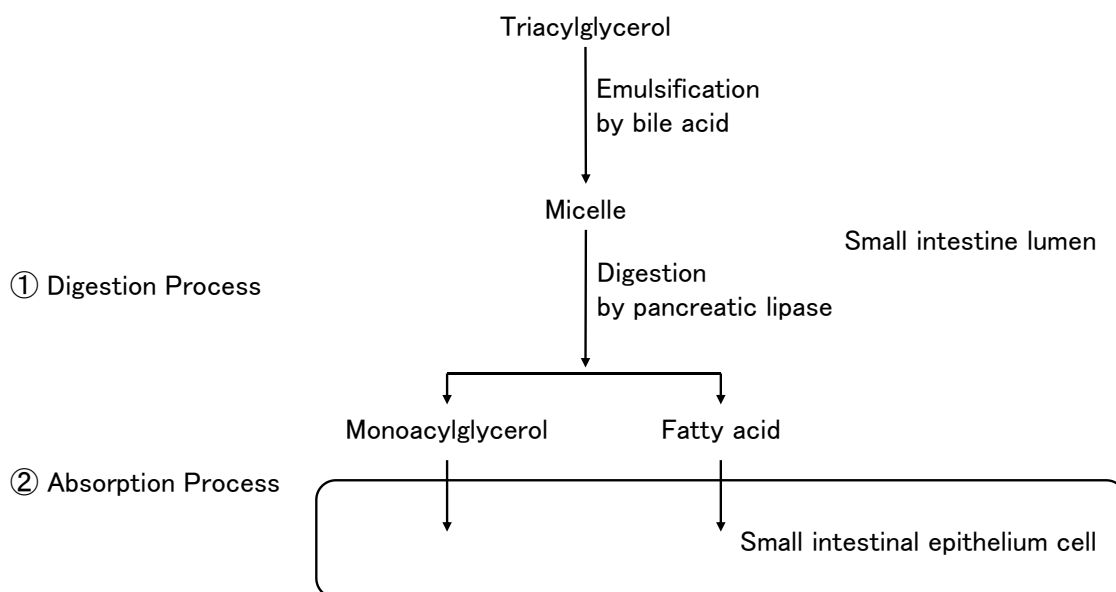


Fig.5-1. Scheme of Triacylglycerol digestion in small intestine

(池尾隆ら, スタンダード生化学・口腔生化学<第3版>, p68-69 および, 菅野道廣, マクロ分子の消化と吸収の機構-III, 脂質の消化と吸収 を参考に作図した)

現在多くの国で抗肥満薬として使用されているオルリスタット(Tetrahydrolipstatin)は、リパーゼを阻害し消化管からの脂肪吸収を 30%前後抑制する。しかしながら、直接的な強いリパーゼ活性の阻害は、副作用として便意急速, 油性便による衣服の汚染, 脂肪便, 下痢, 便失禁などが挙げられている (72)。一方、Ca-Alg の投与では、脂肪便, 下痢等の排便異常は観察されず、糞量の用量依存的な増加は観察されたが、糞中の TG 濃度の異常な増加は見られなかった。RMD に関する既報 (116) においても、ウーロン茶のポリフェノールに関する既報 (117) でも類似の結果であり、便の保形性を維持するうえで脂肪の含有量には一定の限度が存在するものと考えられる。

高コレステロール食を与えたラットの血漿コレステロール濃度の上昇は、Ca-Alg 投与により有意に抑制された。その効果は、2%Ca-Alg 投与群では、高コレステロール血症治療薬のコレスチミド 0.5%投与群と同等レベルであった。考えられるメカニズムは、難消化性食物繊維である Ca-Alg が腸管内の胆汁酸と結合し、これを糞中に排泄する。腸管からの胆汁酸の再吸収が阻害された結果、肝臓でのコレステロールを原料とする胆汁酸合成が促進され、血漿コレステロールの減少につながったものと考えられた。

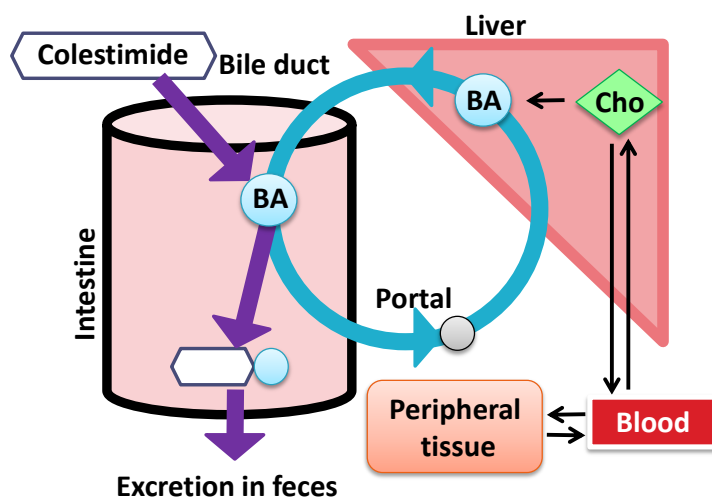


Fig.5-2. Working mechanism of colestimide

BA: bile acid, Cho: cholesterol

作用機序はコレステミドと同様 (Fig. 5-2) であるが、コレステミドでは肝のコレステロールプールが減少するため、この代償作用として肝 LDL 受容体の増加による血中 LDL の取込み亢進が生じるとされている (118)。しかし本実験においては、LDL と HDL は、両方ともテスト期間中上下に変動したため、どのタイプのリポタンパク質が減少したかまでは推定できなかった。この点については更なる実験検討が必要である。

さらに、コレステロール+胆汁酸負荷食を投与した実験では Ca-Alg 投与により胆汁酸排泄は増加したが、脂肪負荷食を投与した実験では胆汁酸排泄量は増加しなかった。Ca-Alg は、脂肪負荷により胆汁酸が必要とされる場合には排泄をせず、過剰に存在する胆汁酸のみ排泄するものと思われる。

Ca-Alg は、Sr と Cs の体外排泄を促進し、吸収を減少させる効果があり、IAEA が推奨する Na-Alg よりも効果と安全性の両面ですぐれていることがわかった。従って、放射性物質の放出を伴う核事故後の有効な保護剤となる可能性がある。

これら一連の研究の中で明らかに共通しているメカニズムは、難消化性食物繊維である Alg の持つイオン交換能と、ゲルマトリックス中に物質を取り込み排出する能力により、物質の消化管からの吸収を抑制するとともに糞への排泄を促進することである。

また胆汁酸の吸着実験の結果から、Alg は、低分子量より高分子量、M-rich より G-rich の方が吸着能力の高いことが示された。これは、Alg が凝集沈殿剤として水処理や醸造の現場で使用される際の品質要求とまったく一致しており、胆汁酸に限らず様々な物質に対して同様の効果が得られるものと考えられる。

現在特定保健用食品として広く流通している低分子化 Na-Alg は、粘性による飲み難さを解決する目的で粘度を極端に下げるため加水分解による低分子化処理を施した Na-Alg が使用されている。その点 Ca-Alg は水に不溶性であり、粘性を示さず、高分子量のまま高用量で服用することができる。また、経口摂取した Alg は、胃の酸性下で結合していた金属イオンを放し遊離酸となり小腸へ移行するため、基本的に消化管内においては経口摂取時の対イオンの影響は受けないものと考えられる。

しかし、遊離酸に変換した後の分子間の立体構造は、Ca-Alg が元々有していた網目状の三次元マトリックス構造をゆるやかに保持している可能性も考えられる。今回の研究の中で Cs の吸着能力において Na-Alg と Ca-Alg で著しい差が観察されたのは、服用時の対イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) の違いによって生じる、胃酸による攻撃を受け膨潤した後の立体構造の違いに起因しているのではないかと推察した。

## 服用する Alg の種類による安全性評価

Alg を食品添加物として使用することの安全性については古くから広く認知されており、FDA では GRAS (Generally Recognized As Safe) 物質に指定され (39)、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) においても一日許容摂取量 (ADI) は「not specified (特定しない)」とされている (40)。しかしながら、Alg の持つ特定の生理作用を利用することを目的とした高用量での長期にわたる反復摂取にあたっては、その安全性についてさらに十分な検討が必要である。

Alg を利用する際には、Ca-Alg での服用の他、いくつかの形態が考えられる。Na 塩、K 塩、あるいは「海藻そのものを食べるべき」との指摘もある。それぞれの摂取形態による安全性について考察した。

### **Na-Alg**

前述の通り、Na は過剰摂取による高血圧発症のリスクが高く、過剰摂取が常態化しているミネラルである。また、本研究においてラットの食餌の 10% をアルギン酸ナトリウムに置き換えた場合、腎臓の腎盤上皮においてミネラル沈着が起こることが示され、沈着物の周囲に上皮過形成が観察された。ミネラル沈着は、腎髄質または腎乳頭上皮にも見られた (Fig. 4-8, Table 4-4)

## K-Alg

Kは、健常人においては特殊な場合（下痢、多量の発汗、利尿剤の服用）を除き、欠乏をきたすことはないミネラルと言われ、K 摂取量を増やすことによって血圧低下、脳卒中予防につながる事が動物実験や疫学的研究によって示唆されている（119）。

WHO のガイドラインでは、生活習慣病予防のために 3,510 mg/日の摂取を推奨している（120）。日本では、高血圧予防のための摂取目標量として 15 歳～74 歳までの男性で 3,000 mg/日、女性で 2,600 mg/日を設定している（29）。

一方で、腎機能低下による高カリウム血症の場合、K の摂取量を 1,500 mg/日以下と、著しく制限しなければならない。この場合に K 含有サプリメントの利用は、血液中の K 濃度が異常に高まり、生命に危険を及ぼす可能性もあると警告されている（121）。慢性腎臓病（CKD：Chronic Kidney Disease）は、かなり進行した段階でなければ自覚症状が現れず、日本では 1,330 万人が CKD を患っていると推計されており（122）、K の習慣的摂取、特に K 含有サプリメントの服用には十分な注意と医学的管理が必要である。

## 海藻を食べる

精製された Alg ではなく、海藻そのものを食べるにより Alg を摂取することも考えられる。実際に海藻粉末を加工したサプリメントも多く流通している。しかしながら、海藻の組織はセルロースなどの不溶性繊維を多く含み、非常に固く、消化管内では崩壊しにくいいため、Alg 分子が溶解して自由に本来の機能を発揮することは非常に難しく、その利用効率はあまり高くないと思われる（123）。

また、海藻に含まれるヨウ素の過剰摂取は、甲状腺機能亢進症、橋本病など深刻な疾病をもたらすことが知られている。連日 1.7 mg/日のヨウ素（ヨウ化物）を摂取した人に甲状腺機能低下が生じたという事実から、アメリカ・カナダの食事摂取基準は成人のヨウ素の耐容上限量を 1.1 mg/日としている（124）。我が国の健康な人を対象にした実験では、昆布から 35～70 mg/日のヨウ素（乾燥昆布 15～30 g）を 7～10 日間摂取した場合に血清 TSH の上昇が起こり（125）、27 mg/日のヨウ素製剤を 28 日間摂取した場合に甲状腺機能低下と甲状腺容積の増加が生じたことが報告されている（126）。北海道住民を対象にした疫学調査では、尿中濃度から 10 mg/日を上回るヨウ素を摂取していると推定される集団においては、甲状腺機能低下の発症率が高いと報告されている（127, 128）。

「日本人の食事摂取基準（2020年版）」によると、ヨウ素の摂取推奨量（必要量）は 0.13 mg、耐用上限量は 3 mg/日（妊婦は 2 mg/日）のところ、日本人のヨウ素摂取量は平均 1.2 mg（1～3 mg）/日と推定され、日本人は十分に必要量を摂取していることがうかがえる（29）。

一方、乾燥コンブ可食部 100 g 当たりのヨウ素含有量は 200 mg（昆布巻き 1 個分のヨウ素含有量は約 20 mg）と非常に高く（129）、海藻の過剰摂取、特に習慣的なヨウ素過剰摂取には十分な注意が必要である。

## Ca-Alg

カルシウムの過剰摂取によって起こる障害として、高カルシウム血症、高カルシウム尿症、軟組織の石灰化、泌尿器系結石、前立腺がん、鉄や亜鉛の吸収障害、便秘などが挙げられる（130）。

「日本人の食事摂取基準（2020年版）」によると

最低健康障害発現量： 3,000 mg/日

耐容上限量： 2,500 mg/日

摂取推奨量（男性）： 750 mg/日

（女性）： 650 mg/日

日本人の推定Ca摂取量平均：505 mg/日

となっている（29）。

上記の厚生労働省の公表数字から計算するとCaの摂取不足量は、男性245 mg/日、女性145 mg/日となり、耐用上限量までは1,750 mg/日となる。

一方、Ca-Algの分子量とCaの原子量から計算すると、1 g のCa-Alg中のCaは、103 mgとなる。IAEAの推奨する投与量4 g/日のCa-Algに含まれるCaは、411 mg/日となり、日本人の推定摂取量平均505 mg/日との合計は916 mg/日となる。摂取推奨量（必要量）750 mg/日を上回り、耐用上限量2,500 mg/日を十分に下回る範囲となる。すなわち、Caの摂取不足を解消しつつも最低健康障害発現量はもとより耐用上限量を大幅に下回ることができる。

上記の通り Ca-Alg を用いることにより、他の Alg あるいは海藻自体が持つ健康障害への懸念が無くなり、極めて安全に Alg のもつ生理的機能を利用することができる。

## 終わりに

サプリメント、特定保健用食品などとして Na-Alg, K-Alg, 海藻粉末などを使用した数多くの商品が流通している。これらの製品に期待される効果としては、血中コレステロールの低下、便秘改善、血圧上昇の抑制、体重増加の抑制、放射性物質や重金属の吸収抑制と体外排泄など様々である。しかし、服用しやすくするための極端な低粘度化が施されていたり、適切な M/G 比に調整された Alg が用いられていなかったり、さらには Na,K,ヨウ素など、習慣的に摂取すると深刻な健康障害をもたらす懸念のある元素を多量に含有するなど、安全性はもとより、有効性についても十分な検討と配慮がなされたものとは言い難い。

本研究により、Ca-Alg を用いることで、より安全で効果の高い製品を提供できることが明らかになった。脂質異常症、放射性物質対策のみならず、Alg の持つ生理的な有用性が更に幅広い分野で安心して利用されるよう、この研究がさらに進展してゆくことを願っている。

## 引用文献

- 1.) “A brief history of dietary fiber and analytical methodology”, www.megazyme.com, 2020.9.22 日  
閲覧
- 2.) John Harvey Kellogg, Autointoxication, 1918
- 3.) Hipsley, E. H. Dietary “Fibre” and Pregnancy Toxaemia. *BMJ* 1953, 2(4833), 420-422.
- 4.) Trowell, H. (1972). Crude fibre, dietary fibre, and arteriosclerosis. *Atheroscler.*, 16(1), 138-140.
- 5.) Trowell, H. (1972). Ischemic heart disease and dietary fibre. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25(9), 0926-932.
- 6.) Trowell, H. C. (1974). Definition of dietary fibre. *Lancet*, 303(7856), 503.
- 7.) 辻啓介 食物繊維の保健効果：*ビフィズス* 8: 125-124, 1995.
- 8.) Kim Y, Je Y. Dietary fiber intake and total mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am. J. Epidemiol.* 2014; 180: 565–73.
- 9.) Wu Y, Qian Y, Pan Y, et al. Association between dietary fiber intake and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Clin. Nutr.* 2015; 34: 603–11.
- 10.) Chen GC, Lv DB, Pang Z, et al. Dietary fiber intake and stroke risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2013; 67: 96–100.
- 11.) Threapleton DE, Greenwood DC, Evans CE, et al. Dietary fiber intake and risk of first stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 2013; 44: 1360–8.
- 12.) Kim Y, Je Y. Dietary fibre intake and mortality from cardiovascular disease and all cancers: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2016; 109: 39–54.
- 13.) Threapleton DE, Greenwood DC, Evans CE, et al. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2013; 347: f6879.
- 14.) InterAct Consortium. Dietary fibre and incidence of type 2 diabetes in eight European countries: the EPIC-InterAct Study and a meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* 2015; 58: 1394–408.
- 15.) Yao B, Fang H, Xu W, et al. Dietary fiber intake and risk of type 2 diabetes: a dose response analysis of prospective studies. *Eur. J. Epidemiol.* 2014; 29: 79–88.
- 16.) Aune D, Chan DS, Greenwood DC, et al. Dietary fiber and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Ann. Oncol.* 2012; 23: 1394–402.
- 17.) Dong JY, He K, Wang P, et al. Dietary fiber intake and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 94: 900–5.
- 18.) Zhang Z, Xu G, Ma M, et al. Dietary fiber intake reduces risk for gastric cancer: a meta-analysis. *Gastroenterologia* 2013; 145: 113–20.e3.

- 19.) Aune D, Chan DS, Lau R, et al. Dietary fiber, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011; 343: d6617.
- 20.) Ma Y, Hu M, Zhou L, et al. Dietary fiber intake and risks of proximal and distal colon cancers: A meta-analysis. *Medicine* (Baltimore) 2018; 97: e11678.
- 21.) Wei B, Liu Y, Lin X, et al. Dietary fiber intake and risk of metabolic syndrome: A meta-analysis of observational studies. *Clin. Nutr.* 2018; 37: 1935–42.
- 22.) Chen JP, Chen GC, Wang XP, et al. Dietary Fiber and Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis and Review of Related Mechanisms. *Nutrients* 2017; 10: E24.
- 23.) Brown L, Rosner B, Willett WW, et al. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69: 30–42.
- 24.) Du H, van der A DL, Boshuizen HC, et al. Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 91: 329–36.
- 25.) Yang J, Wang HP, Zhou L, et al. Effect of dietary fiber on constipation: a meta-analysis. *World. J. Gastroenterolgia.* 2012; 18: 7378–83.
- 26.) Dukas L, Willett WC, Giovannucci EL. Association between physical activity, fiber intake, and other lifestyle variables and constipation in a study of women. *Am. J. Gastroenterol.* 2003; 98: 1790–6.
- 27.) Reynolds A, Mann J, Cummings J, et al. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet* 2019; 393: 434–45.
- 28.) Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J. Am. Diet Assoc.* 2002 Nov;102(11):1621-30..
- 29.) 2020年版「日本人の食事摂取基準」(厚生労働省)
- 30.) 「平成30年国民健康・栄養調査」(厚生労働省)
- 31.) Shigeyuki Nakai, Trends in dietary fiber intake in Japan over last century, *Eur. J. Nutr.* 2002 Oct, 41(5):222-7
- 32.) Stanford, E.C.C. On algin: a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. *Chem. News*, 47, 254. (1883)
- 33.) A. Linker, L. R. Jones: A Polysaccharide resembling Alginic Acid from a Pseudomonas Micro-organism *Nature* 204, 187 (1964)
- 34.) Idota, Y, Kogure Y, Kato T, Yano K, Arakawa H, Niyajima C, Relationship between physical parameters of various metal ions and binding affinity for alginate. *Biol. Pharm. Bull.* 2016; 39:1893-1896.
- 35.) 高橋 武雄, 江村 悟, アルギン酸をイオン交換体とする金属イオンの分離定量, *分析化学* 7(9), 568-571, 1958



- 36.) 高橋 武雄, 江村 悟, 陽イオン交換体としてのアルギン酸, *生産研究* 12(2), 47-52, 1960-02
- 37.) Maiko K. Okajima, Toshimitsu Higashi, Ryuya Asakawa, Tetsu Mitsumata, Daisaku Kaneko, Tatsuo Kaneko, Tetsuya Ogawa, Hiroki Kurata, and Seiji Isoda, Gelation Behavior by the Lanthanoid Adsorption of the Cyanobacterial Extracellular Polysaccharide, *Biomacromolecules* 2010, 11, 11, 3172–3177
- 38.) Food and Drug Administration, HHS, Part184 Direct Food Substances Affirmed as GRAS, 21 CFR Ch, §184.1011, 1133, 1187, 1610, 1724, (4-1-03 Edition)
- 39.) Thirty-ninth Report of the JECFA, Alginate and Its Ammonium, Calcium, Potassium and Sodium Salts, WHO Food Additives Series 30, WHO, Geneva 1993.
- 40.) 平成 18 年厚生労働省令第 195 号
- 41.) 平成 18 年厚生労働省告示第 662 号
- 42.) 杉浦 陽子, 高妻 和哉, 安増 毅, 時光 一郎, 植松 幹雄, 細谷 哲男, 機能性便秘者に対する低分子化アルギン酸ナトリウムおよびグアーガム部分分解物の混合物の便通ならびに腹部不快感の改善に関する最小有効量の検討, *日本家政学会誌*, 2008, 59 巻, 3 号, p. 143-153
- 43.) 林 浩孝, 大野 智, 新井 隆成, 鈴木 信孝, 特定保健用食品「コレステロールが高めの方に適する」表示をした食品について, *日本補完代替医療学会誌*, 2008, 5 巻, 3 号, p. 183-196
- 44.) 大坂道敏. 術後逆流性食道炎に対するアルロイド G (アルギン酸ナトリウム) の使用経験. *診療と新薬*. 17, 1, 161-164, 1980
- 45.) 沢田洋一. 逆流性食道炎に対するアルロイド G の臨床効果. *診療と新薬*. 17, 2, 441-445, 1980
- 46.) 本郷道夫. アルギン酸ナトリウム (アルロイド G) の逆流性食道炎に対する臨床効果. *基礎と臨床*. 16, 10, 5259-5262, 1982
- 47.) Takako Kato, Yoko Idota, Kazuyo Shiragami, Mariko Koike, Fumiya Nishibori, Miho Tomokane, Takahiro Seki, Keiko Itabashi, Keiko Hakoda, Hitoe Takahashi, Kentaro Yano, Tsutomu Kobayashi, Nobuyuki Obara, Takuo Ogihara, Randomized, Double-Blind, Crossover Clinical Trial of the Effect of Calcium Alginate in Noodles on Postprandial Blood Glucose Level, *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1367–1371 (2018)
- 48.) IAEA Radiation protection in the design of radiotherapy facilities. *Safety Reports Series*, No.47 (2009)
- 49.) 特公第 2643669 号『アルギン含有食品』, 1997.8.2., 共成製薬株式会社, 株式会社カイゲン
- 50.) WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva, World Health Organization (WHO), 2012.
- 51.) Nordin BE. Calcium and osteoporosis. *Nutrition*. 1997 Jul-Aug;13(7-8):664-86.
- 52.) Sasaki. S, association between current nutrient intakes and bone mineral density at calcaneus in pre- and postmenopausal Japanese women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2001; 47: 289-94.
- 53.) Cumming RG, Calcium intake and bone mass: a quantitative review of the evidence. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 194-201.

- 54.) Welten DC, A meta-analysis of the effect of calcium intake on bone mass in young and middle-aged females and males. *J. Nutr.* 1995; 125: 2802-13.
- 55.) Nakamura K Calcium intake and 10-years incidence of self-reported vertebral fractures in women and men: The Japan Public Health Centre-based Prospective Study. *Br. J. Nutr.* 2009; 101: 285-94.
- 56.) McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, et al. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science* 1984; 224: 1392-8.
- 57.) Wang L, Manson JE, Buring JE, et al. Dietary intake of dairy products, calcium, and vitamin D and the risk of hypertension in middle-aged and older women. *Hypertension*, 2008; 51: 1-7.
- 58.) Ruidavets JB, Bongard V, Simon C, et al. Independent contribution of dairy products and calcium intake to blood pressure variations at a population level. *J. Hypertens.* 2006; 24: 671-81,
- 59.) van Mierlo LAJ, Arends LR, Streppel MT, et al. Blood pressure response to calcium supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Hum. Hypertens.* 2006; 20: 571-80.
- 60.) “Analysis by cause of death”: <https://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/lifetb16/dl/lifetb16-04.pdf>, Ministry of Health, *Labour and Welfare*, 2016.
- 61.) Kitamura A, Iso H, Naito Y, Iida M, Konishi M, Folsom AR, Sato S, Kiyama M, Nakamura M, Sankai T, Shimamoto T, Komachi Y. High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart disease in urban Japanese men. *Circulation*, 89, 2533-2539 (1994).
- 62.) Iso H, Naito Y, Sato S, Kitamura A, Okamura T, Sankai T, Shimamoto T, Iida M, Komachi Y. Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women. *Am. J. Epidemiol.*, 153, 490-499 (2001).
- 63.) NIPPON DATA80 Research Group. Impact of elevated blood pressure on mortality from all causes, cardiovascular diseases, heart disease and stroke among Japanese: 14 year follow-up of randomly selected population from Japanese (Nippon Data 80). *J. Hum. Hypertens.*, 17, 851-857 (2003).
- 64.) 寺本民生. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012年版. 栄養学雑誌, Vol.71 No.1 3-13 (2013)
- 65.) Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chenu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.*, 34, 154-156 (2003).
- 66.) Yamada K. Fat palatability and lipid metabolism in human body. *Bulletin of School of Health Sciences Sapporo Medical University*, 11, 1-10 (2008).

- 67.) Shibata S, Ikeda Y. Chrono-nutrition of macro-nutrition including lipids. *J. Lipid Nutr*, 24, 53–60 (2015).
- 68.) Koda M, Kawakami M, Murawaki Y, Senda M. The impact of visceral fat in nonalcoholic fatty liver disease: cross-sectional and longitudinal studies. *J. Gastroenterol.*, 42, 897–903 (2007).
- 69.) Vega GL, Chandalia M, Szczepaniak LS, Grundy SM. Metabolic correlates of nonalcoholic fatty liver in women and men. *Hepatology*, 46, 716–722 (2007).
- 70.) Jakobsen MU, Berentzen T, Sorensen TI, Overvad K. Abdominal obesity and fatty liver. *Epidemiol. Rev.*, 29, 77–87 (2007).
- 71.) Eguchi Y, Eguchi T, Mizuta T, Ide Y, Yasutake T, Iwakiri R, Hisatomi A, Ozaki I, Yamamoto K, Kitajima Y, Kawaguchi Y, Kuroki S, Ono N. Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.*, 41, 462–469 (2006).
- 72.) 池田義雄 海外におけるオルリスタットの最近の使用状況 *肥満研究*, Vol.7 No.3 2001.
- 73.) Kumar A, Chauhan G.S, Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase inhibitor. *Carbohydr. Polym*, 82(2), 454-459, (2010)
- 74.) Tsujit T, Takaichi H, Takaku T, Sawai T, Inhibition of lipase activities by basic polysaccharide. *J. Lipid Res.*, 48(2), 189-195. (2007)
- 75.) Pharmaceuticals and Medical Devices Agency Web.  
[http://www.info.pmda.go.jp/download/ph/PDF/200343\\_2329116S1094\\_2\\_01.pdf](http://www.info.pmda.go.jp/download/ph/PDF/200343_2329116S1094_2_01.pdf), 2013.
- 76.) Asaoka T, Iwatuka H, Minowa H. Effect of “CHOLECUT”, a drink containing depolymerized sodium alginate, on serum total cholesterol levels in healthy mates. *Jpn. J. Nutr. As.*, 13, 460–464 (1996).
- 77.) Fujita T, Henry WL, Bartter FC, Lake CR, Delea CS. Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. *Am. J. Med.*, 69, 334–344 (1980).
- 78.) Idota Y, Kogure Y, Kato T, Yano K, Arakawa H, Miyajima C, Kasahara F, Ogihara T. Relationship between physical parameters of various metal ions and binding affinity for alginate. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 1893–1896 (2016).
- 79.) Idota Y, Kato T, Shiragami K, Koike M, Yokoyama A, Takahashi H, Yano K, Ogihara T. Mechanism of suppression of blood glucose level by calcium alginate in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1362–1366 (2018).
- 80.) Kato T, Idota Y, Shiragami K, Koike M, Nishibori F, Tomokane M, Seki T, Itabashi K, Hakoda K, Takahashi H, Yano K, Kobayashi T, Obara N, Ogihara T. Randomized, double-blind, crossover clinical trial of the effect of calcium alginate in noodles on postprandial blood glucose level. *Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1367–1371 (2018).
- 81.) Idota Y, Kogure Y, Kato T, Ogawa M, Kobayashi S, Kakinuma C, Yano K, Arakawa H, Miyajima C, Kasahara F, Ogihara T. Cholesterol-lowering effect of calcium alginate in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 62–67 (2016).

- 82.) Peters AM, Walters JR. Recycling rate of bile acids in the enterohepatic recirculation as a major determinant of whole body <sup>75</sup>SeHCAT retention. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 40, 1618–1621 (2013).
- 83.) Galatola G, Jazrawi RP, Bridges C, Joseph AE, Northfield TC. Direct measurement of first-pass ileal clearance of a bile acid in humans. *Gastroenterology*; 100, 1100–1105 (1991).
- 84.) Kishimoto, Y., Oga, H., Tagami, H. et al. Suppressive effect of resistant maltodextrin on postprandial blood triacylglycerol elevation. *Eur. J. Nutr.*, 46, 133–138 (2007).
- 85.) 榮 昭博, 関崎 悦子, 藤臈リパーゼ活性の阻害に及ぼすキトサンの影響 *桐生大学紀要* 26(0), 51-56, 2015
- 86.) Nishizawa M, Kuda T, Yamagishi T, Tsuji K. Effect of depolymerized sodium alginate on the excretion of cholesterol from rats. *J. Home Econ. Jpn.*, 48, 689–693 (1997).
- 87.) Tamba S, Nishizawa H, Funahashi T, Okauchi Y, Ogawa T, Noguchi M, Fujita K, Ryo M, Kihara S, Iwahashi H, Yamagata K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. Relationship between the serum uric acid level, visceral fat accumulation and serum adiponectin concentration in Japanese men. *Intern. Med.*, 47, 1175–1180 (2008).
- 88.) Sakamaki K, Maejima Y, Tokita Y, Masamura Y, Kumamoto K, Akuzawa M, Nagano N, Nakajima K, Shimomura K, Takenoshita S, Shimomura Y. Impact of the visceral fat area measured by dual impedance method on the diagnostic components of metabolic diseases in a middle-aged Japanese population. *Intern. Med.*, 55, 1691–1696 (2016).
- 89.) “Trends in leading causes of death, Summary of Vital Statistics.”:  
<http://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/populate/dl/03.pdf>, Ministry of Health, Labour and Welfare, 10 March, 2015.
- 90.) Kitamura A, Iso H, Naito Y, Iida M, Konishi M, Folsom AR, Sato S, Kiyama M, Nakamura M, Sankai T, Shimamoto T, Komachi Y. High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart disease in urban Japanese men. *Circulation*, 89, 2533–2539 (1994).
- 91.) Iso H, Naito Y, Sato S, Kitamura A, Okamura T, Sankai T, Shimamoto T, Iida M, Komachi Y. Serum triglycerides and risk of coronary heart disease among Japanese men and women. *Am. J. Epidemiol.*, 153, 490–499 (2001).
- 92.) Lida M, Ueda K, Okayama A, Kodama K, Sawai K, Shibata S, Tanaka S, Keijnkai T, Horibe H, Minowa M, Yanagawa H, Hashimoto T, NIPPON DATA80 Research Group. Impact of elevated blood pressure on mortality from all causes, cardiovascular diseases, heart disease and stroke among Japanese: 14 year follow-up of randomly selected population from Japanese (Nippon Data 80). *J. Hum. Hypertens.*, 17, 851–857 (2003).
- 93.) Nishizawa M, Kuda T, Yamagishi T, Tsuji K. Effect of depolymerized sodium alginate on the excretion of cholesterol from rats. *J. Home Econ. Jpn.*, 48, 689–693 (1997).

- 94.) Peters HP, Koppert RJ, Boers HM, Ström A, Melnikov SM, Haddeman E, Schuring EA, Mela DJ, Wiseman SA. Dose-dependent suppression of hunger by a specific alginate in a low-viscosity drink formulation. *Obesity*, 19, 1171–1176 (2011).
- 95.) Georg Jensen M, Kristensen M, Astrup A. Effect of alginate supplementation on weight loss in obese subjects completing a 12-week energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96, 5–13 (2012).
- 96.) Stamler J, Rose G, Stamler R, Elliott P, Dyer A, Marmot M. INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. *Hypertension*, 14, 570–577 (1989).
- 97.) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497–509 (1957).
- 98.) Peters AM, Walters JR. Recycling rate of bile acids in the enterohepatic recirculation as a major determinant of whole body <sup>75</sup>SeHCAT retention. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.*, 40, 1618–1621 (2013).
- 99.) Galatola G, Jazrawi RP, Bridges C, Joseph AE, Northfield TC. Direct measurement of first-pass ileal clearance of a bile acid in humans. *Gastroenterology*, 100, 1100–1105 (1991).
- 100.) The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. “Monitoring information of environmental radioactivity level.”:  
[http://radioactivity.mext.go.jp/ja/contents/6000/5043/24/11555\\_0830.pdf](http://radioactivity.mext.go.jp/ja/contents/6000/5043/24/11555_0830.pdf), cited 30 September, 2011.
- 101.) The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. “Monitoring information of environmental radioactivity level.”:  
[http://radioactivity.mext.go.jp/ja/contents/6000/5048/24/5600\\_0930\\_n.pdf](http://radioactivity.mext.go.jp/ja/contents/6000/5048/24/5600_0930_n.pdf), cited 30 September, 2011.
- 102.) Nishimura Y, Wui IS, Kim KY, Watari K, Imai K, Inaba J, Matsusaka N. Effect of chitosan and alginate on the biokinetics of radiostrontium in rats. *Radioisotopes*, 40, 244–247 (1991).
- 103.) Zhang HQ, Lin AP, Sun Y, Deng YM. Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22, 1121–1124 (2001).
- 104.) Bandazhevskaya GS, Nesterenko VB, Babenko VI, Yerkovich TV, Bandazhevsky YI. Relationship between caesium (<sup>137</sup>Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in ‘Chernobyl’ children—preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss Med. Wkly.*, 134, 725–729 (2004).
- 105.) Nishizawa M, Kuda T, Yamagishi T, Tsuji K. Effect of depolymerized sodium alginate on the excretion of cholesterol from rats. *J. Home Econ. Jpn.*, 48, 689–693 (1997).

- 106.) Peters HP, Koppert RJ, Boers HM, Ström A, Melnikov SM, Haddeman E, Schuring EA, Mela DJ, Wiseman SA. Dose-dependent suppression of hunger by a specific alginate in a low-viscosity drink formulation. *Obesity*, 19, 1171–1176 (2011).
- 107.) Georg Jensen M, Kristensen M, Astrup A. Effect of alginate supplementation on weight loss in obese subjects completing a 12-week energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96, 5–13 (2012).
- 108.) Ichihashi H, Kondo T., Imamura T. Hemostasis of massive upper-gastrointestinal hemorrhage by sodium alginate. *J. Jpn. Soc. Clin. Surg.*, 40, 1169–1172 (1968).
- 109.) Hesp R, Ramsbottom B. Effect of sodium alginate in inhibiting uptake of radiostrontium by the human body. *Nature*, 208, 1341–1342 (1965).
- 110.) Radiation protection in the design of radiotherapy facilities. *Safety Reports Series*, No. 47, IAEA, Vienna (2006).
- 111.) Kimica Corporation Web site.: [http://www.kimica-alginate.com/alginate/chemical\\_structure.html](http://www.kimica-alginate.com/alginate/chemical_structure.html), 2009.
- 112.) Pauling L. The Nature of the Chemical Bond, 3rd Ed., Cornell University Press, Ithaca, N.Y. (1960).
- 113.) Matthew D. Wilcox, Lain A. Brownie, Craig Richardson, The modulation of pancreatic lipase activity by alginates. *Food Chem.* 146(2014), 479-484
- 114.) Catherine Taylor, Jeffery P Pearson, Kurt I Dragt, Rheological characterization of mixed gels of mucin and alginate *Carbohydr. Polym.* 59, 2,(2005), 189-195
- 115.) Yoko Idota, Takako Kato, Kazuyo Shiragami, Mariko Koike, Akari Yokoyama Mechanism of Suppression of Blood Glucose Level by Calcium Alginate in Rats *Biol. Pharm. Bull* 41, 9, 1362-1366. 2018
- 116.) Yuka Kishimoto, Yuko Yoshikawa, Shoko Miyazato, Hiroshi Oga, Effect of Resistant Maltodextrin on Digestion and Absorption of lipids. *J. Health Sci.*, 55(5)823-844, (2009)
- 117.) Han L, K. Takaku T, Li J, Kimura Y, Okuda H, Anti-obesity action of oolong tea, *Int. J. Obesity*. 23: 98-105. 1999
- 118.) 三津家正之 他, *薬理と治療*, 24 (Suppl.4) S-577-S-584, (1996)
- 119.) Preuss HG. Electrolytes: sodium, chloride, and potassium. In: Bowman BA, Russell RM, eds. Present knowledge in nutrition, 9th ed, Vol. I. ILSI Press, Washington D.C., 2006: 409–21.
- 120.) WHO Guideline: Potassium intake for adults and children. Geneva, World Health Organization (WHO) , 2012.
- 121.) 東京女子医科大学病院腎臓病総合医療センター 「慢性腎臓病の食事療法」  
<http://www.twmu.ac.jp/NEP/shokujiryohou.html> (2020年8月10日閲覧)
- 122.) 日本腎臓学会編 *CKD 診療ガイド 2012* 東京医学社
- 123.) 木村 典雄, 2, 3 海藻の消化吸収率に就て, *栄養と食糧*, 1952-1953, 5 巻, 5 号, p. 176-179.

- 124.) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Iodine. In: Institute of Medicine, ed. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. National Academies Press, Washington D. C., 2001: 258–89.
- 125.) Miyai K, Tokushige T, Kondo M, et al. Suppression of thyroid function during ingestion of seaweed “Kombu” (*Laminaria japonica*) in normal Japanese adults. *Endocr. J.* 2008; 55: 1103–8.
- 126.) Namba H, Yamashita S, Kimura H, et al. Evidence of thyroid volume increase in normal subjects receiving excess iodide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 76: 605–8.
- 127.) Konno N, Makita H, Yuri K, et al. Association between dietary iodine intake and prevalence of subclinical hypothyroidism in the coastal regions of Japan. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 78: 393–7.
- 128.) 今野則道, 飯塚徳男, 川崎君王, 他. 北海道在住成人における甲状腺疾患の疫学的調査 ヨード摂取量と甲状腺機能との関係, *北海道医誌* 1994; 69: 614–26.
- 129.) 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) 文部科学省
- 130.) Institute of Medicine. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. National Academies Press, Washington D.C., 2011.

## 謝辞

本研究の遂行と本学位論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導ご鞭撻を賜りました高崎健康福祉大学薬学部教授 萩原琢男先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり貴重なご助言とご協力を頂きました高崎健康福祉大学薬学部 井戸田陽子様, 柿沼千早様, 加藤多佳子様, 木暮悠美様, 高橋仁恵様, 伴野拓巳様, 原田瞳様, 深井悠貴様, 森本かおり様, 矢野健太郎様に心より感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、ご指導と貴重なご助言を頂き、ご協力くださいました東京大学大学院農学生命科学研究科 小林彰子特任准教授, 小川真奈様に感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、ご協力くださいました金沢大学医薬保険研究域薬学系 荒川大助教に感謝いたします。

本研究に当たり、深いご理解とご協力を頂きました宮島千尋様、並木友亮様、望月博様をはじめとする株式会社キミカの従業員の皆様に心より感謝いたします。

最後に、常に励まし支えてくれた笠原貞子様に深く感謝いたします。