

水浸拘束ストレスにより惹起されるラット胃潰瘍および幽門結紮により惹起されるラット胃酸分泌に対する微細藻類ドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*) 投与の効果

松下映夫*¹・田中竜介*¹

Effects of *Dunaliella Bardawil* Administration on Gastric Ulcer Induced by Water-Immersion Restraint Stress and Gastric Secretion Induced by Pylorus-Ligation in Rats

Teruo Matsushita*¹ and Ryusuke Tanaka*¹

Effects of peroral treatment of rats with *Dunaliella bardawil* containing high concentration of β -carotene on gastric ulcer induced by water-immersion restraint stress and gastric secretion induced by pylorus-ligation were examined. Peroral treatment of rats with *Dunaliella bardawil* (150 mg/kg/day) for 14 days significantly reduced the formation of gastric ulcer induced by water-immersion restraint stress, but failed to inhibit gastric secretion induced by pylorus-ligation. These results suggest that β -carotene contained in *Dunaliella bardawil* directly could protect the gastric mucosal lesions induced by stress without the influence of gastric acid secretion.

1 緒 言

消化管はストレスに対し敏感であり、胃の機能の調節には多くの神経系やホルモン系が関与している^{1, 2)}。ストレスなどが原因となる胃潰瘍の発生には神経やホルモンのみならず、胃粘膜から分泌される胃酸も胃粘膜自身に対して傷害因子として働くため、胃酸分泌は胃潰瘍の発生に密接に関係していること³⁾、さらに胃潰瘍発症のメカニズムには活性酸素やラジカルが関与すること^{4, 5)}が知られている。野菜類のみならず海藻類や魚介類など水産物にも多く含まれるカロテノイドはラジカルや活性酸素種を消去する抗酸化作用を有している^{6, 7)}。なかでも、代表的なカロテノイドである β -カロテンについては、酸化ストレスが関係する病態を改善するという多くの報告があるが⁸⁻⁹⁾、消化管障害に対しても β -カロテンが抑制的に作用することが報告されている^{10, 11)}。

微細藻類に属するドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) は天然型 β -カロテンを高濃度に含有しており¹²⁾、健康食品

材料として有用性が注目されている。ストレスにより誘発される胃潰瘍に対するドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の作用については、ラットの餌に混合して摂取させた条件下で若干の検討がなされているが^{13, 14)}、胃潰瘍発症を促進する胃酸の分泌への影響については全く検討されていない。今回われわれは、水浸拘束ストレスによる胃潰瘍発症と幽門結紮による胃酸分泌の二つの実験系を用いて、強制経口投与によりドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) をラットに摂取させる条件下で、胃潰瘍の発症が抑制されるか否か、そして、胃酸分泌に対して影響を与えるか否かについて検討したので報告する。

2 材料および方法

2.1 実験動物

ラットはWistarラット (オス, 6~7週齢) をセアック吉富(株)より購入し、室温23~26℃で飼育したものを実験に供した。

2.2 被験物質および試薬

ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の乾燥藻体は(株)日健総本社 (岐阜県羽島市) より恵与されたものを用いた。ホルマリン (ホルムアルデヒド37%含有) およびツイーン60は和光純薬(株) (大阪市中央区) より購入し用いた。また、有機溶媒類は試薬特級グレードのものを用いた。

2.3 ラットへのドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*) の投与

ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の乾燥藻体を乳鉢中で2%ツイーン60/生理食塩水に懸濁させ、この懸濁液を用いて、150mg/kgの用量で、1日1回強制経口投与 (5ml/kg) を14日間行った。対照群のラットには2%ツイーン60/生理食塩水を同様に強制経口投与 (5.0ml/kg) した。第1日~13日までは、市販のラット用の餌 (CRF-1, オリエンタル酵母(株)) と水 (水道水) を自由に摂取させた。水浸拘束ストレス負荷または幽門結紮の処理 (第14日) を行う24時間前からラットを絶食させた。

2.4 水浸拘束ストレス誘発ラット胃潰瘍実験

ラットを金属製の拘束ストレスケージ (夏目製作所(株)) に挿入し、自由に動けない状態に置いた。ケージごとラットを水温25℃の恒温水槽に胸部まで浸し、水浸拘束ストレスを6時間負荷した。ストレス負荷終了後、ラットをエーテル麻酔下に頸椎脱臼により安楽死させた後開腹し、胃の噴門部および幽門部を結紮した。10%ホルマリン/リン酸緩衝液pH7.2 (5.0ml) を胃の内腔に注入して胃壁を軽く固定したのち胃を摘出し、大弯に沿って切開し10%ホルマリン/リン酸緩衝液pH7.2中で胃壁を完全に固定した後、腺胃部の胃壁の潰瘍の有無を観察した。また、潰瘍部分の大きさ (長さ) の総和 (mm) を計測し、3回計測したその平均値をラット1匹あたりの潰瘍スコア (Severity score)¹⁵⁾ とした。

2.5 幽門結紮ラットによる胃液 (胃酸) 分泌実験

ラットをエーテルによる軽麻酔下で開腹し、Shayらの方法¹⁶⁾ に準じて、胃の幽門と十二指腸との間を結紮した。閉腹の縫合手術を行った後、5~10分程度でラットは麻酔から覚醒するので、そのまま通常のケージに放置した。4時間経過後、ラットにクロロホルムを吸入させ死亡させたのち開腹し、胃を摘出し分泌された胃液を試験管に収集した。遠心分離して不溶物を除き、胃液量を測定した。また、

pHメーターで胃液のpHを測定し、0.01MのNaOHによりpH7.0まで滴定を行い、中和に要したNaOHの量より、胃液中の酸分泌量を求めた。

2.6 ドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*) および餌に含まれるβ-カロテンの定量

ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の乾燥藻体粉末 (10mg程度) または、市販の餌 (乳鉢で粉末にしたもの10mg程度) をネジ付き試験管に秤取し、クロロホルム:メタノール (2:1) 混液を加えVortexで≡拌後、遠心分離 (2500rpm, 5分間) し上清を採取した。残渣にクロロホルム:メタノール (2:1) 混液を再度加え、同様の操作を行って上層を採取し、先に採取した上層とあわせて (この抽出操作を3回繰り返した)。エバポレーターで溶媒を除き、最後にヘキサン:アセトン (85:15) に溶解し、高速液体クロマト (HPLC) 分析に供した。

HPLCのカラムはLichrosorb 5 μ Si 60A (サイズ:250×4.0mm) を用い、室温で移動相 (ヘキサン:アセトン (85:15)) を流速1.0ml/minで流した。β-カロテンのピークを紫外可視分光検出器により波長455nmで検出し、定量した。

2.7 統計処理

比較する群間の等分散を確認し、t-検定を実施した。

3 結果

3.1 ドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*) および餌に含まれるβ-カロテンの定量と体内に摂取されたβ-カロテン量

クロロホルム:メタノール (2:1) 抽出後のHPLC分析により、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の乾燥藻体粉末中には、27.1 μ g/mgの濃度でβ-カロテンが存在することがわかった (Table 1)。また、市販のラットの餌 (CRF-1, オリエンタル酵母(株)) には、1.25 μ g/gの濃度でβ-カロテンが含まれていた (Table 1)。

ドナリエラの投与用量を150mg/kg/dayと設定したため、ラット (実験期間中の平均体重は230g) がドナリエラ投与を通じて体内に摂取するβ-カロテン量は936 μ g/day (4.07mg/kg/day) であった (Table 1)。なお、餌の摂取 (実験期間の平均摂餌量は27g/day) を通じて体内に取り込まれるβ-カロテン量は33.8 μ g/day (0.147mg/kg/day) であった (Table 1)。

Table 1. Concentration of β -carotene in *Dunaliella bardawil* and feed, and average intake of β -carotene in rats administered perorally by *Dunaliella bardawil*.

	β -carotene		
	Concentration	Intake (average)	
		ratio	
<i>Dunaliella</i>	27.1 μ g/mg	936 μ g/day ¹⁾ (4.07mg/kg/day)	28
Feed	1.25 μ g/g	33.8 μ g/day ²⁾ (0.147mg/kg/day)	1

1) Average body weight of rats was 230g.

2) Average amount of feed was 27.0g/day.

3.2 水浸拘束ストレス誘発ラット胃潰瘍に対するドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*) の投与の効果

Fig. 1のPanel Aの写真に示すように、2%ツイーン60/生理食塩水を14日間強制経口投与した対照群のラットにおいて、水浸拘束ストレス負荷により胃潰瘍の発生が認められた。ストレスを負荷しないラットでは胃潰瘍の発生は全くみられなかった (Fig. 1のPanel C)。ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) を150mg/kg/dayの用量で14日間強制経口投与した群のラットでは、Fig. 1のPanel Bの写真に示すように、水浸拘束ストレス負荷による胃潰瘍の発生の程度が減少していた。胃潰瘍の組織標本を計測して求めた潰瘍スコア (Severity score) のデータをTable 2に示す。ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 投与群では対照群に比して、潰瘍スコア (Severity score) の統計学的に有意な減少が認められた。

3.3 幽門結紮ラットによる胃液 (胃酸) 分泌に対するドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 投与の効果

2%ツイーン60/生理食塩水を14日間強制経口投与した対照群のラットにおいて、幽門結紮により胃液の貯留量 (Fig. 2 panel A) および酸分泌量 (Fig. 2 panel B) が大きく増加した。ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) を150 mg/kg/dayの用量で14日間強制経口投与した群のラットで

は、幽門結紮による胃液の分泌に対し、顕著な影響を与えなかった。即ち、胃液の貯留量 (Fig. 2 panel A) および酸分泌量 (Fig. 2 panel B) とともに、対照群 (2%ツイーン60/生理食塩水を14日間強制経口投与したラット) に比して、平均値が若干低下する傾向がみられたが、統計学的に有意なものではなかった。

4 考 察

予備的な検討 (データは示さない) において、純品の β -カロテンを150mg/kgの用量でラットに腹腔内投与を行うと、対照群に比して全身状態が悪化して摂餌量も少なくなり体重減少がみられ、この β -カロテン150mg/kgの用量はラットで毒性発現する用量と考えられた。従って、 β -カロテンを含有するドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) を連日投与する本研究の実験においては、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の投与を介して摂取される β -カロテンの量を少なくとも10倍以上低くする必要があると考えられた。実際に本実験では、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 藻体の投与量として150mg/kgを設定した。この用量では、 β -カロテンに換算した時の投与量が、上記の体重減少がみられた毒性発現用量 (150mg/kg) の少なくとも20倍以上の開きがある低い用量であるため、ラットの体調に支障が出ないと予想されること、また、 β -カロテンが通常用いる餌にも含まれるため、この餌を介して摂取される量に対

し、約30倍の量の β -カロテンがこの用量のドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) から摂取しうることから、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 由来の β -カロテンの効果を検討する目的で用いる投与量として適当であると考えられる。実際に、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 150mg/kgを14日間強制経口投与したラットでは、2%ツイーン60/生理食塩水を14日間強制経口投与した対照群のラットと比較しても、体重増加および餌の摂取量に全く差がなく、体調には問題が認められなかった。

本研究より、ラットにおいてドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 投与 (藻体150mg/kgを14日間強制経口投与) に

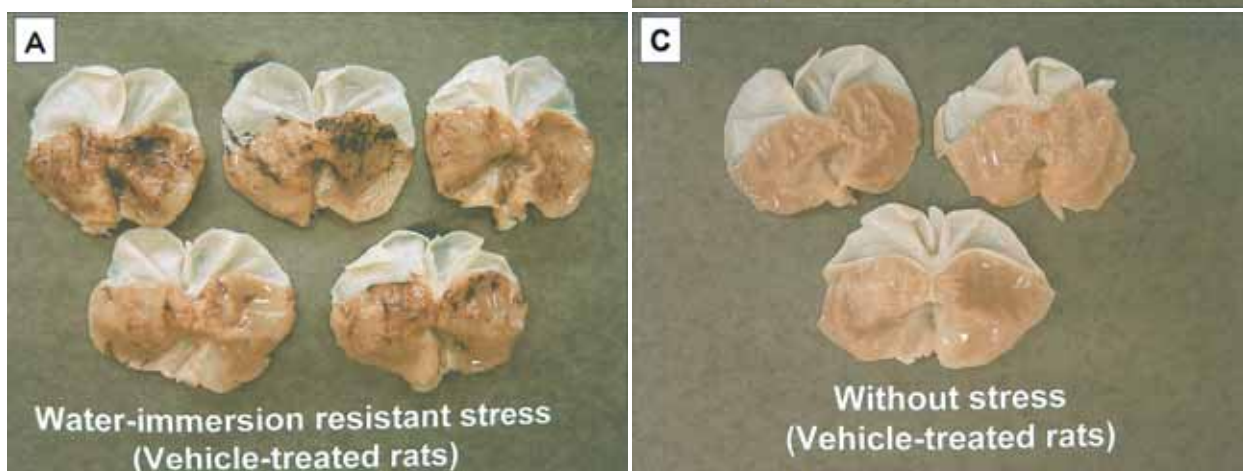


Fig. 1. Effect of *Dunaliella bardawil* administration on gastric ulcer induced by water-immersion restraint stress in rats. The pictures in panel A and B show the gross appearance of each stomachs in rats administered perorally by vehicle (2% Tween 60 in saline) (panel A) or *Dunaliella bardawil* (150mg/kg/day) (panel B) for 14 days before the loading of water-immersion restraint stress. The pictures in panel C show the gross appearance of each stomachs without stress loading in rats administered perorally by vehicle (2% Tween 60) for 14 days before the experiment.

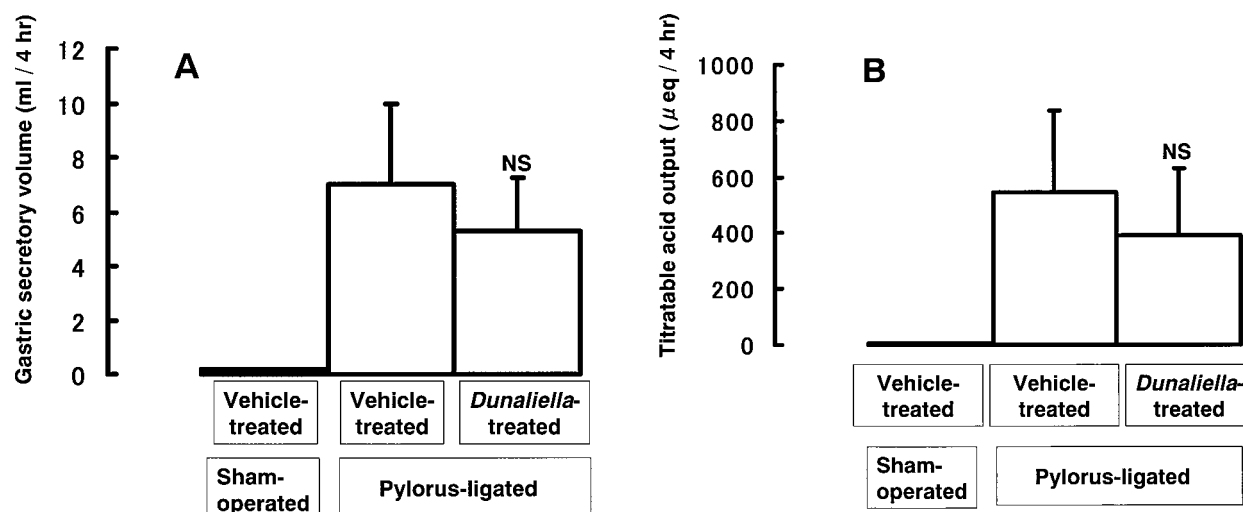


Fig. 2. Effect of *Dunaliella bardawil* administration on gastric secretion in pylorus-ligated rats. Panel A and B shows the results of volume of gastric secretory and titratable acid output, respectively. Before experiment of pylorus-ligation, rats were administered perorally by vehicle (2% Tween 60 in saline) or *Dunaliella bardawil* (150mg/kg/day) for 14 days. Each column and vertical bar represent the mean \pm standard deviation of 4-5 determinations, respectively. NS means not significant vs vehicle-treated, pylorus-ligated rats.

Table. 2. Effect of treatment with *Dunaliella bardawil* on water-immersion restraint stress-induced ulcer in rats.

Group	Water-immersion restraint stress	Treatment	Severity score (mm)
A	Loaded	Vehicle	126 ± 61.0 (n = 5)
B	Loaded	<i>Dunaliella</i>	39 ± 22.1 * (n = 4)
C	Not loaded	Vehicle	0 (n = 3)

* P<0.05 vs group A, n; number of rats

より、水浸拘束ストレスによる胃潰瘍発症が抑制されることが示された。既に、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の水浸拘束ストレス誘発胃潰瘍に対する効果はラットの餌にドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) を0.05~0.1%混合して摂食させた条件下で検討されその抑制作用が報告されているが^{13, 14)}、そのドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の1日あたりの摂取量を計算すると約60~120mg/kg/dayとなり、われわれが本研究で用いた用量とほぼ匹敵するものである。したがって、実験方法において混餌であるか強制経口投与であるかという若干の違いがあるが、両者の実験結果は一致するため、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の経口摂取はストレス潰瘍を抑制しうるということが強く示唆される。

一方、本研究より、幽門結紮による胃酸分泌に対してドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 投与 (150mg/kgを14日間強制経口投与) は影響を与えないことが明らかとなった。従って、ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) 藻体投与によるβ-カロテンの摂取は、胃酸の分泌を抑制して攻撃因子から間接的に胃潰瘍発症を抑制するメカニズムはほとんど関与せず、もっぱらラジカルや活性酸素の攻撃から胃粘膜細胞の傷害を防御する抗酸化のメカニズムにより胃潰瘍発症を抑制している可能性が考えられる。なお、β-カロテン自体の投与においても幽門結紮によるラットの胃酸分泌に対してほとんど影響しないという報告があり¹⁷⁾、本研究の結果と矛盾せず、お互いの結果を支持しあうものであ

る。

以上より、本研究において、β-カロテンを高濃度に含有する微細藻類のドナリエラの体内への摂取は、胃酸分泌に影響を与えずにストレスにより誘発される胃潰瘍の発症を抑制しうるということが明らかとなった。ただし、有意差は検出されなかったものの、ドナリエラ投与群の胃酸分泌が減少傾向にあったことや、ドナリエラ単回投与群では抗潰瘍効果は見られないのかなど、今後の検討すべき課題が残されている。

謝 辞

ドナリエラ (*Dunaliella bardawil*) の乾燥藻体を提供いただいた株式会社日健総本社 (岐阜県羽島市) に感謝いたします。

文 献

- 1) S. Szabo and Gy. Mozsik : New Pharmacology of Ulcer Disease-- Experimental and New Therapeutic Approaches. Elsevier, New York (1987).
- 2) 山崎幹夫：創薬を支える薬用天然資源の役割 --Matrine及びOxymatrineの薬理活性を例題として. 薬学雑誌, 120, 1025-1033 (2000).
- 3) H. Kitagawa, M. Fujiwara and Y. Osumi : Effects of

- water-immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats. *Gastroenterology*, 77, 298-302 (1979).
- 4) T. Otamiri and R. Sjodahl : Oxygen radicals: their role in selected gastrointestinal disorders. *Dig. Dis.*, 9, 133-141 (1991).
- 5) 吉川敏一：活性酸素と病気--消化器疾患, 活性酸素と栄養(水上茂樹, 五十嵐脩 編), 光生館, 東京都, pp 212-220 (1995).
- 6) 清水延寿・幹渉：活性酸素消去活性, 水産学シリーズ94海産生物のカロテノイド--代謝と生物活性(幹渉編), 恒星社厚生閣, 東京都, pp 97-104 (1993).
- 7) 木村進：カロテノイド成分と変色, 光琳テクノブックス18 食品の変色の化学(木村進・中林敏郎・加藤博通編), 光琳, 東京都, pp 187-290 (1995).
- 8) 月田潔：生体成分としてのカロテノイドとレチノイドを追う. *栄養学雑誌*, 46, 203-210(1988).
- 9) J. Terao : Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24, 659-661 (1989).
- 10) G. Mozsik, O. Karadi, A. Kiraly, A. Debreceni, M. Figler, L. Nagy, G. Par, G. Suto and A. Vincze: The key-role of vagal nerve and adrenals in the cytoprotection and general gastric mucosal integrity. *J. Physiol. Paris*, 95, 229-237 (2001).
- 11) T. Javor, M. Bata, L. Lovasz, F. Moron, L. Nagy, I. Patty, J. Szabolcs, F. Tarnok, G. Toth and G. Mozsik : Gastric cytoprotective effects of vitamin A and other carotenoids. *Int. J. Tissue React.*, 5, 289-296 (1983).
- 12) A. Fried, A. Tietz, A. Ben-Amotz and W. Eichenberger : Lipid composition of the halotolerant Alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochem. Biophys. Acta*, 713, 419-426 (1982).
- 13) H. Takenaka, H. Takahashi, K. Hayashi and A. Ben-Amotz: Protective effect of *Dunaliella bardawil* on water-immersion-induced stress in rats. *Planta Med.*, 59, 421-424 (1993).
- 14) 伊藤要子・伊藤ユキ：天然 β -カロテンのストレス潰瘍抑制効果--ラットの浸拘束ストレス実験による検討. *ビタミン*, 72, 267-271 (1998).
- 15) S. Yano and M. Harada : A method for the production of stress erosion in the mouse stomach and related pharmacological studies. *Japan. J. Pharmacol.*, 23, 57-64(1973).
- 16) H. Shay, S.A. Komorov, S.S. Fels, D. Merange, M. Gruentel and M. Sipler : A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*, 5, 43-61 (1945).
- 17) G. Mozsik, M. Bata, M. Fiegler, T. Javor, L. Nagy, I. Patty, G. Toth and F. Tarnok : Interrelationship between the membrane-bound ATP-dependent energy systems of the gastric mucosa and gastric cytoprotective effect of beta-carotene on the development of gastric mucosal damage produced by 0.6 M HCl in rats. *Acta Physiol. Hung.*, 64, 301-307 (1984).