報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.62, No.4, pp.743~747, 1988]

酵母マンナンの血圧降下作用

小林 徹, 佐藤朋一, 稲岡 計, 高野 敏,
伊藤 進, 斎藤誠宏, 鈴木一郎*, 森地敏樹*
(花王株式会社栃木第1研究所, *農林水産省畜産試験場)

昭和62年9月14日受理

Antihypertensive Activity of Yeast Mannan

Tohru KOBAYASHI, Tomokazu SATOH, Hakaru INAOKA, Satoshi TAKANO,
Susumu ITO, Masahiro SAITOH, Ichiro SUZUKI* and Toshiki MORICHI*

Tochigi Research Laboratories of Kao Corporation,
2606 Akabane, Ichikai, Haga, Tochigi 321-34

*National Institute of Animal Industry,
Tsukuba, Norindanchi, P.O. Box 5, Ibaraki 305

The antihypertensive effect of yeast extract mannan was tested on male spontaneously hypertensive rats (SHR). Mannan purification was performed by acid-methanol precipitation and gel filtration on Bio gel A-0.5m. The structure of the isolated mannan was confirmed by infrared and ^{13}C -NMR spectroscopies, and sugar analysis. The antihypertensive effect of yeast mannan was clear at 50~100 mg/kg at 2~6 hr after intraperitoneal administration, and at 100~200 mg/kg at 4~6 hr after oral administration. When administered intraperitoneally, yeast mannan was equal to α -methyldopa (positive control) in antihypertensive activity. A commercially available mannan from *Saccharomyces cerevisiae* also lowered SHR blood pressure.

(Received September 14, 1987)

緒 言

マンナンは、植物・微生物界に広く分布する D-マンノースを主構成糖とする多糖類の総称である。植物由来のマンナンは β -結合から成り、ゾウゲヤシの種子、ラン科植物の塊根、紅藻、コーヒー豆、山芋等から得られるものが古くから知られている。一方、微生物由来のマンナンは α -結合から成り、*Saccharomyces* 属、*Rhodotorula* 属、*Penicillium* 属、*Bacillus* 属等から得られるものが知られている⁽¹⁾。これらのなかで、とくに *Saccharomyces* 属のマンナンおよびその誘導体が、免疫促進作用⁽²⁾、抗腫瘍作用^(3,4)、抗感染作用⁽⁵⁾、インターフェロン誘導活性⁽⁶⁾等の生理活性作用を有することが報告されている。

先にわれわれは、グループ N streptococci がクエン酸存在下で異常連鎖を生じることを報告してきたが⁽⁷⁻⁹⁾、その機構を解明する目的で培地中に分泌される

細胞成分の詳細な同定を行った。その途上、培地成分の酵母エキス中に、種々の生理活性を見出した。本報告では培地成分の酵母エキス中のマンナンが高血圧症ラットに対して血圧降下作用を有することを初めて見出したので詳述する。

実 験 方 法

1. 実験材料 酵母マンナンは、酵母エキス (Difco) から精製したものと市販標品 (Sigma) を用いた。血圧降下作用の検定には、市販 (Charles River Japan) の自然発症高血圧ラット (SHR)、12~14 週齢の雄 (1 群 7 匹) を用い、実験に供する 2 週間前より、温度 23 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55 $\pm$ 5% の環境下にて、固形飼料 (日本クレア社製、CE-2) および水道水を自由に与え飼育した。

2. 酵母エキス中のマンナンの精製 酵母エキス (Difco) 100 g を 700 ml のイオン交換水に溶解後、3 N 塩酸を用いて pH 3.5 に調整した。生じた不溶物を遠心

分離 (3000 rpm, 10 分) で除去した後, 上清に 3 倍量の冷メタノールを添加し, 約 15 分間ゆるやかに攪拌し, 生じた不溶物を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) により集め, 50 ml のイオン交換水に懸濁した. この液を 1 N 水酸化ナトリウムで pH 7.0 に調整し, 不溶物を遠心分離 (18,000 rpm, 10 分) により除去した. 上記の, 一連の操作を 5 回繰り返し, 最終的に得られた溶液 30 ml に RNase T₁ (Sigma) を約 250 単位添加し 25°C で一昼夜放置した. その後, クロロホルム: メタノール (25:1, v/v) 混液 30 ml を加えよく振盪し水層部を分取した. 水層部に 0.85 g の水酸化カリウムを添加し (0.5 M), 溶解後 37°C で 1 時間振盪した後, 3 N 塩酸にて pH を 3.5 まで下げ 3 倍量の冷メタノールを添加し, 生じた不溶物を遠心分離 (3000 rpm, 10 分) で集めた. 沈殿物をイオン交換水に懸濁し, 1 N 水酸化ナトリウムで中和溶解後, イオン交換水に対し一昼夜透析を行い, 内液を凍結乾燥した. 得られた乾燥物を少量のイオン交換水に溶解し, Bio gel A-0.5 m (2.5×70 cm) によるゲル濾過を行った. 0.1 M 塩化カリウムで溶出 (流速; 4.3 ml/hr·cm²) しフェノール硫酸法⁽¹⁰⁾で, 呈色する画分を集め, イオン交換水に対し一昼夜透析後, 凍結乾燥を行った. 以上の操作により 100 g の酵母エキスを約 2 g の多糖画分を得た.

3. 血圧測定法 Tail cuff 法により, ラット尾動脈収縮期血圧をラット尾動脈圧・脈拍測定装置 KN-209 (夏目製作所製) により測定した. SHR を恒温箱中で 40°C 13 分間静置後, その血圧・脈拍を測定し (0 時間), マンナンを腹腔内あるいは経口投与してから, 2, 4, 6, 24 時間後まで上記の方法により血圧・脈拍を測定した.

得られた数値は, 平均値と標準偏差で表示し, *t*-test により有意差検定を行った (有意水準; $P < 0.05$ および $P < 0.01$).

4. 機器および分析条件 ガスクロマトグラフ: 島津製作所製 GC-4 CM およびデータ処理装置クロマトパック C-R 2 AX. カラム 3 mm×2 m, 3% シリコン OV-17. キャリヤーガス N₂, 流量 40 ml/min. カラム温度 200°C. 検出器 FID. 高速液体クロマトグラフ: カラム東洋曹達社製 TSK gel PW-4000. 溶出液 0.2 M リン酸緩衝液 pH 7.0. 流速 1.2 ml/min. 検出器 示差屈折率計 (Shodex SE-31). 赤外分光光度計: 日立製作所製 270-30 型. 旋光分析計: 堀場製作所製 SEPA-200. 核磁気共鳴装置: 日本電子社製 GX-270.

実験結果および考察

1. 酵母エキスより精製した酵母マンナンの分析

酵母エキスより精製した酵母マンナン中の全糖量, 蛋白量およびリン酸含有量をそれぞれフェノール硫酸法⁽¹⁰⁾, Lowry 法⁽¹¹⁾および Ames と Dubin⁽¹²⁾ の方法に従って定量した. その結果, 91 重量%の糖, 3.2 重量%の蛋白 (ウシ血清アルブミン当量として) および 0.87 重量%のリン酸をそれぞれ含有していた.

精製標品の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ ($c = 1.0$, H₂O) は +58.0° であった. また, 赤外吸収スペクトルにおいて $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹; 3400 (水酸基), 2900 (メチレン), 1150 (エーテル), 1070 (第 1 アルコール), 835 (グリコピラノシド結合) の特徴的吸収が観察された. 標品を 2 N トリフルオロ酢酸中にて加水分解後 (100°C, 12 時間), 水素化ホウ素ナトリウムで還元し, ピリジン/無水酢酸を用いてアセチル化した後, ガスクロマトグラフィーにより分析したところ, マンニトールのアセチル誘導体と保持時間 (27.0 分) の一致する唯一のピークを認めた. さらに箱守法⁽¹³⁾を用いて標品のメチル化, 加水分解, 還元, 次いでアセチル化し, ガスクロマトグラフィーで分析したところ, 2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル体, 3, 4, 6-トリ-O-メチル体, 2, 4, 6-トリ-O-メチル体および 3, 4-ジ-O-メチル体得られ, それぞれモル比は 2:1:1:2 であった. 同様にメチル化分析を行った市販酵母マンナンの結果 (モル比 2:1:0.9:1.9) とよく一致した. さらに, ¹³C-核磁気共鳴スペクトルを, DSS を内部標準物質とし, 重水中 60°C で測定したところ, δ (ppm): 102.5, 102.4, 101.0, 100.9, 98.8 (C-1), δ : 79.0, 78.9, 78.6, 78.4 (結合に関与している C-2 および C-3), δ : 73.7 (C-5), δ : 71.7, 71.1, 70.9, 70.8, 70.5 (C-2 および C-3), δ : 67.4, 67.3, 67.0, 66.7, 66.2 (C-4 および結合に関与している C-6), δ : 61.6 (C-6) にシグナルが認められ, 市販酵母マンナンとよく一致するスペクトルを与えた. なお, これらの炭素シグナルの帰属は, Kocis らが報告した⁽¹⁴⁾ケミカルシフトを参考にした. また, 高速液体クロマトグラフィーを行ったところ, 幅広い 5 個の主たるピークとして分画され, それぞれの主たる分子量は 235,000, 110,000, 51,000, 30,000 および 16,000 であり, 重量比は, 約 1.2:1.7:1:1:1 であった.

以上述べたごとく, 酵母エキスより精製した標品が広

Table I. Effects of Intraperitoneal Administration of Yeast Mannan on the Systolic Blood Pressure (SBP) and Heart Rate (HR) of Male SHR

	Compound administrated	Dose (mg/kg)	Time after administration (hr)				
			0	2	4	6	24
SBP (mmHg)	No addition	—	206±8.8*	207±5.6	194±17.0	194±10.4	203±7.7
	Isolated mannan (Difco)	50	202±11.8	177±30.0	158±36.0	179±15.2**	198±15.0
		100	204±12.0	163±39.3	161±33.2	181±21.2*	200±16.9
	Mannan (Sigma)	100	217±15.8	140±1.4**	143±8.0**	174±10.8**	210±12.4
	α-Methyldopa	50	206±6.1	169±39.8	167±37.2	173±18.8	197±9.4
		100	210±11.4	180±14.9*	149±33.7	159±32.9	209±12.1
HR (beats/min)	No addition	—	570±16.6	554±13.6	550±14.2	535±22.3	542±12.0
	Isolated mannan (Difco)	50	571±25.3	549±41.8	545±25.0	536±28.3*	557±23.4
		100	579±12.8	544±31.7	531±34.5	542±18.8**	538±32.5
	Mannan (Sigma)	100	576±19.4	490±23.3**	526±17.7**	556±20.1	564±12.8
	α-Methyldopa	50	552±27.2	525±19.6	482±39.0**	483±16.5**	534±11.9
		100	559±19.6	524±38.4	459±75.2	469±73.1	533±36.5

* Mean±SD (n=7). * P<0.05, ** P<0.01; statistically significant, compared with 0 hr.

Table II. Effects of Oral Administration of Yeast Mannan on the Systolic Blood Pressure (SBP) and Heart Rate (HR) of Male SHR

	Compound administrated	Dose (mg/kg)	Time after administration (hr)				
			0	2	4	6	24
SBP (mmHg)	No addition	—	195±12.8*	192±8.1	190±8.2	190±8.4	195±6.0
	Isolated mannan (Difco)	100	200±6.9	193±11.2	187±5.7**	187±8.2**	199±7.4
		200	204±7.2	204±9.2	195±6.2*	188±14.0*	204±10.4
	Mannan (Sigma)	100	213±9.2	205±8.8	204±11.4	198±8.9**	213±12.0
		200	206±6.8	209±7.4	197±6.4*	197±6.0*	213±5.7
	α-Methyldopa	100	201±8.4	190±6.8*	175±15.1**	170±12.2**	189±10.7*
HR (beats/min)	No addition	—	550±19.2	550±30.1	540±33.5	547±36.7	553±18.7
	Isolated mannan (Difco)	100	543±25.9	541±33.2	538±29.2	520±34.8	533±32.7
		200	539±26.4	539±23.4	519±17.1	509±15.1*	522±17.2
	Mannan (Sigma)	100	546±23.0	518±40.0	514±24.6*	515±25.3	520±21.4
		200	543±34.8	528±32.3	522±41.2	526±36.1	528±37.4
	α-Methyldopa	100	532±24.1	512±43.4	474±41.7**	443±21.9**	471±37.6**

* Mean±SD (n=7). * P<0.05, ** P<0.01; statistically significant, compared with 0 hr.

範囲の分子量を有する酵母マンナンであることが判明した。市販酵母マンナンは、上記定量法を用いると全糖 94.8 重量%, 蛋白 0.9 重量%, リン酸 1.51 重量%をそれぞれ含有し、比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ ($c=1.0$, H_2O) は +78.5° であり、分子量は、約 100,000~150,000 と推定された。

2. 酵母マンナンの血圧降下作用

酵母エキスから精製した標品と市販酵母マンナンを 50, 100 mg/kg となるように 0.8 ml の生理食塩水に溶解し、SHR の腹腔内に投与した後 2, 4, 6, 24 時間の血圧および脈拍の経時変化を測定した (Table I)。対照として生理食塩水 0.8 ml を投与した群、陽性対照として α-

メチルドーパを 50, 100 mg/kg となるように生理食塩水 0.8 ml に溶解し、投与した群を用いた。表中、腹腔内投与では、酵母エキスより精製したマンナンを用いると、50 mg/kg 投与群で投与前の血圧に比べ 2, 4, 6 時間後にそれぞれ 25, 44, 23 mmHg の血圧降下作用 (降下率はそれぞれ 12.4, 21.8 および 11.4%) があり、100 mg/kg 投与群でも 41, 43, 23 mmHg の血圧降下 (降下率はそれぞれ 20.1, 21.1 および 11.3%) が認められた。一方、市販の酵母マンナン 100 mg/kg 投与群においても投与前の血圧に比べ 2, 4, 6 時間後にはそれぞれ 77, 74, 43 mmHg の有意な血圧降下 (降下率はそれぞれ 35.5, 34.1 および 19.8%) が認められ、陽性コント

ロールとして用いた α -メチルドーパと同等あるいはそれ以上の降圧作用を示すことが判明した。

次に、精製酵母マンナンおよび市販酵母マンナンを 100, 200 mg/kg となるようにイオン交換水（体重 100 g 当り 1 ml）に溶解したものを SHR に経口投与した後、2, 4, 6, 24 時間の血圧および脈拍の経時変化を測定した（Table II）。対照としてイオン交換水を投与した群、陽性対照として α -メチルドーパを 100 mg/kg となるように投与した群についてもそれぞれ同様に測定した。その結果、酵母マンナンを経口投与しても血圧降下が認められた。すなわち、酵母エキスより精製した酵母マンナン 100 mg/kg 投与群では投与前に比べ 4 および 6 時間後にそれぞれ 13 mmHg の有意な血圧降下作用（降下率はそれぞれ 6.5%）があり、200 mg/kg 投与群においても同様に 9 および 16 mmHg の有意な血圧降下（降下率はそれぞれ 4.4 および 7.8%）が認められた。また市販の酵母マンナンにおいても、100 mg/kg 投与群では投与前に比べ 4 および 6 時間後にそれぞれ 9 および 15 mmHg の有意な血圧降下作用（降下率はそれぞれ 4.2 および 7.0%）があり、200 mg/kg 投与群でも同様にそれぞれ 9 mmHg の有意な血圧降下（降下率はそれぞれ 4.4%）が認められた。精製標品を経口投与すると血圧降下作用は陽性コントロールとして用いた α -メチルドーパ 100 mg/kg 投与群に比較しやや弱かった。すなわち、 α -メチルドーパ投与群では、投与後 2, 4, 6, 24 時間で、それぞれ 11, 26, 31 および 12 mmHg の有意な血圧降下作用（降下率はそれぞれ 5.5, 12.9, 15.4 および 6.0%）を有していた。

一方、腹腔内および経口投与のいずれにおいても脈拍も減少するという事象が観察された（Table I および Table II）。精製酵母マンナンによる脈拍の最大減少率は、腹腔内投与（100 mg/kg）群で 8.3%，経口投与（200 mg/kg）群で 5.6% であり、市販酵母マンナンを供試すると、腹腔内投与（100 mg/kg）群で 14.9%，経口投与（100 mg/kg）群で 5.9% であった。また、 α -メチルドーパ投与群の脈拍の最大減少率は、腹腔内投与（100 mg/kg）で 17.9%，経口投与（100 mg/kg）で 16.7% であった。

高分子多糖に血圧降下作用を有する類例として靈芝の抽出エキス（経口投与）があり⁽¹⁵⁾、作用成分は分子量 10 万以上の糖、アミノ糖、アミノ酸等を含む高分子化合物であると考えられている。またクマザサの水可溶画分

（主として多糖類を含む）においても SD 系ラットへの静注により血圧降下作用が認められている⁽¹⁶⁾。酵母マンナンの血圧降下作用は新知見であるが、その作用機構が利尿作用、交換神経への作用、血管拡張作用等⁽¹⁷⁾によるものか、全く異なる機構によるかについて検討を加えていきたい。

要 旨

酵母エキスから精製したマンナンが自然発症高血圧ラット（SHR）の血圧降下作用を有することを認めた。精製標品の構造は、赤外吸収スペクトル、¹³C-核磁気共鳴スペクトルおよび構成糖分析により決定した。

精製酵母マンナンを腹腔内投与すると、50～100 mg/kg の投与群で 2～6 時間後に、また、経口投与すると、100～200 mg/kg の投与群で 4～6 時間後に有意な血圧降下作用を示した。また、市販の酵母マンナンを用いて、血圧降下作用を確認した。酵母マンナンの血圧降下作用は、陽性対照として用いた α -メチルドーパに比べ、経口投与ではやや弱く、腹腔内投与では同程度あるいはそれ以上であった。

- (1) 三崎 旭：高分子，17，569（1968）。
- (2) 伊藤幸雄，櫻田龍雄，黒葛原 啓，小野保利：特開昭 50-46823。
- (3) K. Hashimoto, Y. Okawa, K. Suzuki and M. Suzuki: *J. Pharm. Dyn.*, 6, 668 (1983)。
- (4) 鈴木茂生，鈴木益子，松本達二，三上 健：特開昭 53-96085。
- (5) 鈴木益子，鈴木茂生，松本達二，大川善男，大倉 靖：特開昭 58-109423。
- (6) S. Suzuki, M. Suzuki, M. Imaya and F. Chaki: *Jpn. J. Microbiol.*, 16, 1 (1972)。
- (7) S. Ito, T. Kobayashi, M. Saitoh and T. Morichi: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2205 (1984)。
- (8) S. Ito, N. Yoshizuka, T. Kobayashi, M. Saitoh and T. Morichi: *Agric. Biol. Chem.*, 49, 231 (1985)。
- (9) S. Ito, T. Kobayashi, K. Ozaki, T. Morichi and M. Saitoh: "Food Microstructure," Vol. 6, Scanning Microscopy International, Chicago, 1987, p. 17,
- (10) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)。
- (11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. I. Farr and A. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)。
- (12) B. N. Ames and D. T. Dubin: *J. Biol. Chem.*, 235, 769 (1960)。

- (13) S. Hakomori : *J. Biochem.*, **55**, 205 (1964).
 - (14) P. Kocis, L. Masler, J. Sandula, A. I. Usov, A. S. Shashkov and S. V. Yarotskii : *Bioorg. Khim.*, **10**, 536 (1984).
 - (15) 有地 滋, 谿 忠人, 久保道徳, 松田秀秋, 吉村成年, 桐ヶ谷 紀昌 : 基礎と臨床, **13**, 175 (1979).
 - (16) 柴田 丸, 久保恭子, 小野田 真 : 薬学雑誌, **98**, 1436 (1978).
 - (17) 池本文彦, 岩尾 洋, 山本研二郎 : 化学と生物, **19**, 482 (1981).
-