

氏 名(本籍) 越 智 宏 倫

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 371 号

学位授与年月日 平 成 元 年 10 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 ユーグレナによる微量栄養素の蓄積とその  
栄養補助剤としての利用に関する基礎  
的研究

論文審査委員 (主 査)

教授 山内 文男

教授 木村 修一

教授 大久保一良

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

人間が毎日摂取する食物に含まれる栄養素は、比較的多量に摂取されるマクロ栄養素（タンパク質、糖質、脂質）と比較的少量および微量に摂取されるミクロ栄養素（ビタミン、無機質）とに分かれる。最近の食事の内容は比較的变化に富み、普通の食生活ではビタミンや無機質に不足をおこすことは余りなかったが、心身の不調よりの回復や健康増進の目的でミクロ栄養素を服用する傾向があり、ここに保健量なる概念がつくられた。これはミクロ栄養素は欠乏症状に対する予防のためだけではなく、若干余分に摂ることによって積極的な保健効果を期待するものである。

これまでの栄養補助剤は主として化学合成によって得られたビタミン類と化学薬品としての無機塩類を混合して製造されている。ビタミンや無機質が有効に利用されるためにはそれらが能率よく吸収され、組織内を輸送され、細胞内のしかるべき部位で活性化型に変換される必要がある。化学薬品としてのビタミンと無機質の混合物はこの点自然食品に含まれているような生物学的に活性化形態と異なり、栄養素としての有効性にも問題がある可能性がある。

ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は、動物と植物の双方に分類される、極めて興味ある生物で、酵母・クロレラ・スプルリナなどにおける栄養蓄積に比べて、細胞膜が薄く、ミクロ栄養素の吸収が良く、またこれを摂取したときに消化性が良いことにおいて優れている。

本研究は上述の論点から生体内に含有される形態でのビタミン類、無機質を豊富に含む栄養補助剤の製造を意図し、その材料として原生動物のユーグレナを選び基礎的研究を行ったものである。

## 第2章 ユーグレナのビタミン要求性とその応用

単細胞原生動物であるユーグレナがビタミン $B_1$ と $B_{12}$ を成育に必要とすることは古くから知られており、又、ビタミン $B_{12}$ の定量用生物として広く用いられてきた。このことから、ユーグレナにとってビタミン $B_1$ および $B_{12}$ が、生育に必要なことは間違いないと思われるが、それに関する正確な知見は少ない。

そこで私はまず、ユーグレナにおけるこれらビタミンの、正確な要求

性を明らかにし、次に、ビタミンB<sub>1</sub>とB<sub>12</sub>の制限および欠乏細胞の調製法について検討し、更に、ビタミンB<sub>1</sub>の定量法であるチオクロム蛍光法とは別の、新しいビタミンB<sub>1</sub>の定量法を、ユーグレナのビタミンB<sub>1</sub>制限および欠乏細胞を用いて確立した。

更にこれを用いて、数種の食品のビタミンB<sub>1</sub>を定量し、チオクロムプレラベル高速液体クロマトグラフィー法との比較検討を行なった(表1)。

更にユーグレナのビタミンB<sub>12</sub>制限細胞のペリクル(細胞膜複合体)に高いビタミンB<sub>12</sub>の結合活性が存在することに着目し、これを用いて新しいビタミンB<sub>12</sub>定量法を確立し、更に実際に人血清中のビタミンB<sub>12</sub>の定量を行ない、Shephadex-IF(内因子)複合体を用いた従来のものと比較検討した(表2)。

### 第3章 ユーグレナの各種ビタミンの取り込みと蓄積

原生動物であるユーグレナはビタミンB<sub>1</sub>とB<sub>12</sub>を生育必須因子として要求するが、それ以外のビタミンはすべて自家合成できる。そこで本研究ではユーグレナがどれほどの各種ビタミンの蓄積能および合成能を有するかを検討し、ビタミン剤等栄養補助剤としての利用の可能性について考察した。

ユーグレナの各種ビタミンの取り込み能および蓄積能を検討するために、培地中に各種水溶性ビタミン(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C, ビオチン, 葉酸, パントテン酸, ニコチン酸, p-アミノ安息香酸)を大量添加し検討した。その結果、ユーグレナはビタミンB<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, p-アミノ安息香酸, ビオチン, 葉酸, パントテン酸を外部より細胞内に取り込まなかったが、ビタミンB<sub>1</sub>, B<sub>12</sub>およびニコチン酸は細胞内に多量に取り込み蓄積した(図1)。そして、この時のユーグレナの各種ビタミンの最大含有量を酵母と比較し(表3)に示す。この表には脂溶性ビタミンのビタミンEとβ-カロチンのデータも含んでいる。その結果、ユーグレナは酵母よりも多様なビタミンを高濃度に合成および蓄積する能力があることが明らかとなった。またビタミンB<sub>1</sub>とB<sub>12</sub>についての結果からユーグレナは複数のビタミンを同時に与えると相乗効果で取り込み量が増大した。

#### 第4章 ユーグレナにおける前駆体投与によるビタミン産生

ユーグレナが各種ビタミンを生合成および取り込みにより高濃度に蓄積し、それらビタミンの種類および含有量は酵母よりも多様で高濃度であることを明らかにした。そこで今度は個々のビタミン含有量の一層の増加をはかることを目的として、まず初めにユーグレナの生育に伴う各種ビタミン(B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, E, β-カロチン)含有量の変動を検討し、その後光照射と前駆体添加によるビタミン含有量の増加について検討した。また生合成されないビタミンB<sub>1</sub>およびB<sub>12</sub>については活性型である補酵素型への変換について検討した。その結果、ビタミンB<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, E, β-カロチンの生合成はいずれも光の影響を強く受けた(図2, 3, 4)。前駆体添加実験によりビタミンCはL-ガラクトノ-δ-ラクトン添加により約32倍に増加し(表4)、ビタミンEはホモゲンチジン酸により約2.4倍に(表5)、β-カロチンはメバロン酸により約1.7倍に増加した(表6)。またユーグレナにはビタミンB<sub>1</sub>とB<sub>12</sub>の機能的で効率の良い取り込み系と補酵素合成系が存在することが明らかとなった(図5)。

#### 第5章 貯蔵によるユーグレナ細胞内ビタミン含量の変動

ユーグレナが多様なビタミンを高濃度に蓄積することが明らかとなりユーグレナの細胞自体が非常にバランスの取れた総合ビタミン剤として利用できることが示された。しかしながら、このようにして得られた細胞でも生産後の貯蔵条件により蓄積したビタミンの著しい分解がおこれば商品価値は、大きく減少する危険性がある。そこでユーグレナ細胞に蓄積されたビタミンの貯蔵による安定性について検討した。その結果、-20℃で貯蔵することによりユーグレナ細胞内各種ビタミン(特にB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> およびB<sub>12</sub>)含有量は6箇月間安定に保持されたが、常温では含量の減少が見られた(図6)。

#### 第6章 ビタミン欠乏ラットへのユーグレナ細胞投与の効果

ユーグレナ細胞のビタミン剤としての有効性および実用性を実際の動物実験により検討した。まずビタミン欠乏ラットを作製し、そのラットにユーグレナ細胞を含む飼料を数日にわたり投与し、その欠乏症状の回

復、体重増加および生体内ビタミン含有量を測定し、その有効性を試験した。なお各種ビタミンの代表として脂溶性はビタミンA( $\beta$ -カロチン)、水溶性はビタミンB<sub>12</sub>について検討した。その結果、ビタミンAおよびB<sub>12</sub>のいずれの欠乏ラットもユーグレナ細胞添加飼料を与えることにより著しい欠乏症状の回復と体重増加を示した(図7,8)。さらに投与後血清および肝臓中の各ビタミン含有量を測定した結果、これら欠乏ラットは正常状態に回復していることが示された。このことはユーグレナ細胞に蓄積されたビタミンが生体内で十分に吸収され機能していることを示しており、ユーグレナ細胞がビタミン剤として有効であることが示された(表7,8)。

## 第7章 ユーグレナの無機質の要求性と蓄積

これまでユーグレナに各種ビタミンを蓄積させ、新規の総合ビタミン剤の開発を追及してきた。その延長としてユーグレナによる無機質の取り込みと蓄積の状況を調べ、無機質に関してもユーグレナ細胞が栄養補助剤として利用できるかを検討するために、まずユーグレナの無機質の要求性と蓄積について調べた(図9)。その結果、ユーグレナの生育には少なくともZn, Mg, Fe, Mnが必須であることが明らかとなった(図10, 11, 12, 13)。またユーグレナに各無機質を通常の10倍および100倍量を添加しその蓄積について検討した結果、Ni, Co, Ca過剰添加によりユーグレナの生育は著しく抑制されたが、その他のMg, Fe, Mn, Zn, Cuには耐性を持っていた(図14)。この時、ユーグレナはMg, Mn, Zn, FeおよびCuを細胞内に取り込み、それぞれ正常細胞の4.2倍、30倍、16倍、3倍、130倍の蓄積量を示した(表9)。このうちZnについて調べたところ無機塩はタンパク質と結合した有機態で存在していた(図15)。

## 第8章 ラットにおけるユーグレナの亜急性毒性試験

上述したように微量栄養素を生理的に活性な形で多量に含有させたユーグレナ細胞は新型の総合ビタミン・無機質剤として、優れた栄養補助剤あるいは機能食品として利用される可能性がある。しかしユーグレナ細胞がヒトおよび他の高等動物に摂取され利用されるためには、それが無毒であり、摂取によって異常をおこさないことが前提として必須条件となる。そこでユーグレナの長期投与による毒性試験を厚生省の亜急性

毒性試験のガイドラインに従って行ない、ラットの生育、血液、尿成分に及ぼす影響を検討した。その結果、雌雄ラット共に外見的所見、生育などユーグレナ細胞摂取による異常と考えられる変化は認められなかった(図16, 表10, 11, 12)。また血液、尿、腎および肝臓での生化学的検査でもユーグレナ食群と対照群の間に大きな差異はなかった(表13, 14, 15)。この結果からユーグレナには亜急性毒性因子は存在しないものと判断された。

## 要 約

ユーグレナはビタミンB<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, p-アミノ安息香酸, ビオチン, 葉酸, パントテン酸を外部より細胞内に取り込まなかったが、ビタミンB<sub>1</sub>, B<sub>12</sub> およびニコチン酸は取り込み蓄積した。この時のユーグレナの各ビタミンの最大含有量を酵母と比較するとユーグレナは多様なビタミンを高濃度に合成および蓄積する能力のあることが明らかとなった。さらに照射など培養条件を変え、また生合成前駆体を添加することにより数種の脂溶性および水溶性ビタミンは大きく含有量を増加させることができた。またビタミンB<sub>1</sub>とB<sub>12</sub> についての結果からビタミンは生化学的に活性化補酵素型に変換されて蓄積されることが判明した。

ユーグレナの無機質の蓄積について検討した結果、過剰の無機質を与えるとユーグレナはMg, Mn, Zn, Fe およびCuを細胞内に取り込み、それぞれ通常の数倍から数十倍の蓄積量を示し、それらはタンパク質と結合した有機態として存在することが示唆された。以上のようにユーグレナの培地組成および培養条件等を組み合わせることによりビタミンや無機質の微量栄養素を活性化形で多量に含む細胞が調整できることが明らかとなった。ユーグレナ細胞の総合ビタミン剤としての有効性をビタミン欠乏ラットを用いて検討した結果、ユーグレナ細胞に含有されているビタミンが十分に生体内で吸収され機能していることが示され、高濃度にビタミンを蓄積したユーグレナ細胞は総合ビタミン剤として十分に有効であり、利用できる結論した。

ラットを用いてユーグレナ細胞の毒性について検討した結果、ユーグレナ細胞には亜急性毒性因子は存在しないことが明らかとなり、ユーグレナ細胞の食品としての安全性が確認された。

表1 異なる定量法による数種の食品中のビタミンB<sub>12</sub>含有量の比較

食品	(μg/g 湿重量)		
	14C-ビタミンB <sub>12</sub> , ユーグレナのビタミンB <sub>12</sub> 欠乏		HPLC法
	系釈法	細胞によるバイオアッセイ法	
牛肝臓	1.9±0.2	2.0±0.2	2.1±0.1
牛乳	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1
ホウレン草 (葉)	1.4±0.1	1.4±0.2	1.4±0.1
マアジ (筋肉)	1.1±0.1	1.3±0.2	1.2±0.1
はっさく (果肉)	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1

Mean ± SD (n = 3)

表2 ユーグレナのペリクルとブタ内因子-セファデックス複合体を用いて測定した人血清中のビタミンB<sub>12</sub>含有量の比較.

症例	ビタミンB <sub>12</sub> 含有量 (pg/ml)	
	ユーグレナのペリクルを用いた方法	ブタ内因子-セファデックス複合体を用いた方法
1	300	360
2	330	450
3	260	350
4	380	500
5	370	535
6	340	460
7	450	550
8	435	535

表3 ユーグレナと酵母の細胞内ビタミン含有量の比較.

ビタミン	含有量 (mg/g 乾体重量)	
	ユーグレナ※	酵母※※
B <sub>1</sub>	1.4±0.1 (7.9±0.3) §	7.0~25.0
B <sub>2</sub>	3.5±0.2	1.7~8.2
B <sub>6</sub>	7.5±0.6	2.3~10.0
B <sub>12</sub>	0.05±0.01 (1.4±0.1) §	0
C	27.2±0.4 (425) #	0
E	155±5.4	0
葉酸	1.7±0.5	1.9~5.9
パントテン酸	12.9±0.1	5.9~7.2
ニコチン酸	18.2±0.4 (41.0±0.2) §	30.0~63.0
ピオチン	4.6±0.3	0.08~0.11
β-カロチン	174±7.5	0

※Mean ± SD (n=4).

※※ [32]

§ 各種ビタミンを過剰添加したKH培地で6日間生育させたユーグレナの最大ビタミン含有量.

# [23]

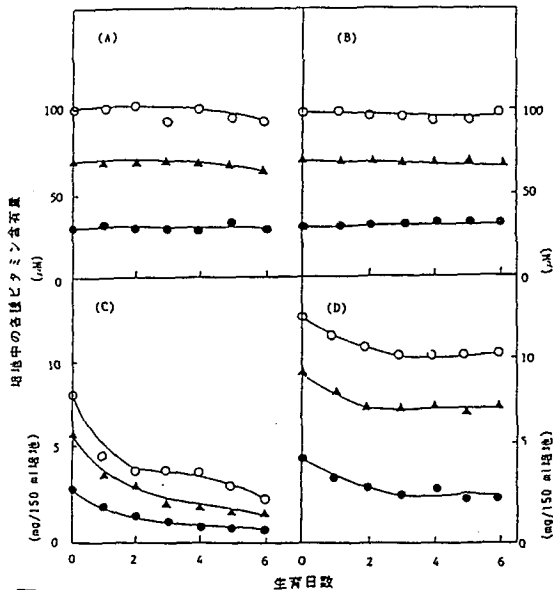


図1 ユーグレナの生育における培地中からの各種添加ビタミンの減少量.

A. ビオチン; B. p-アミノ安息香酸; C. ビタミンB<sub>1</sub>; D. ビタミンB<sub>12</sub>.

A, B, C: ●, 30 μM; ▲, 70 μM; ○, 100 μM.

D: ●, 3 μM; ▲, 7 μM; ○, 10 μM.

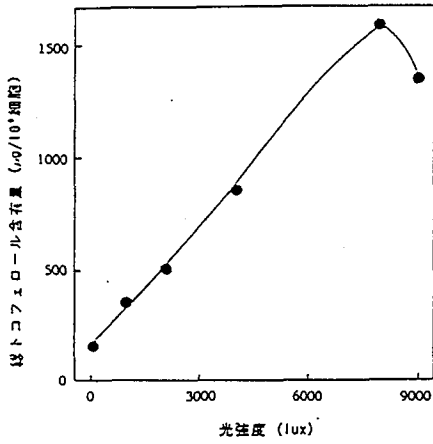


図 2 ユーグレナのトコフェロール含有量に及ぼす光強度の影響。

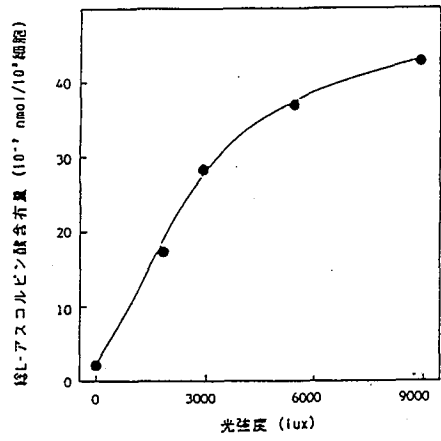


図 3 ユーグレナのL-アスコルビン酸含有量に及ぼす光強度の影響。

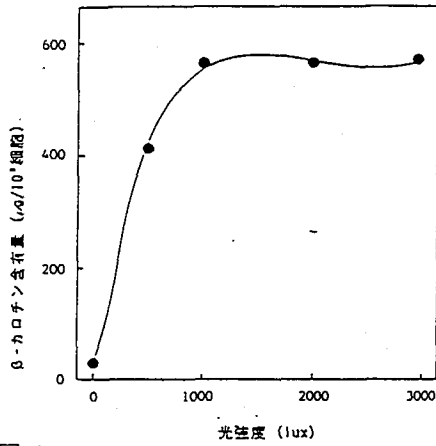


図 4 ユーグレナのβ-カロチン含有量に及ぼす光強度の影響。

表 4 L-アスコルビン酸合成における前駆体投与の効果。

化合物	相対的増加率 (%)
無添加	100
L-アラビノース	102
D-グルコース	128
D-ガラクトース	117
D-マンノース	92
D-フルクトース	97
D-グルクロン酸	208
D-ガラクツロン酸	394
D-グルクロノ-γ-ラクトン	346
D-グルコノ-δ-ラクトン	103
L-グルノ-γ-ラクトン	226
L-ガラクトノ-γ-ラクトン	3164

表 5 トコフェロール合成における前駆体投与の効果。

化合物	相対的増加率 (%)
無添加	100
シキミ酸	112
チロシン	147
フェニルアラニン	133
α-ヒドロキシフェニルビリン酸	99
ホモゲンテジン酸	237
メバロン酸	106

表 6 β-カロチン合成における前駆体投与の効果。

化合物	相対的増加率 (%)	β-カロチン量 (mg/g乾体重量)
無添加	100	19.1
メバロン酸	176	33.6
ファルネソール	124	23.6
エタノール	129	24.6



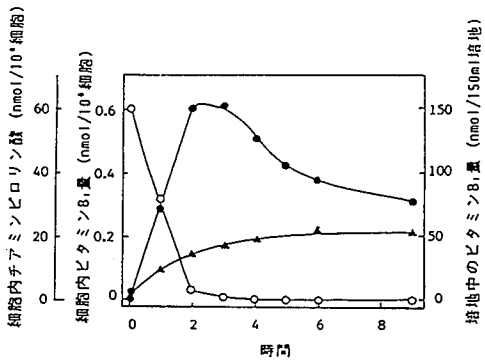


図 5 ユーグレナにおけるビタミンB<sub>12</sub>の取り込みと補酵素型への変換。  
●, 細胞内ビタミンB<sub>12</sub>; ▲, 細胞内チアミンピロリン酸; ○, 培地中のビタミンB<sub>12</sub>.

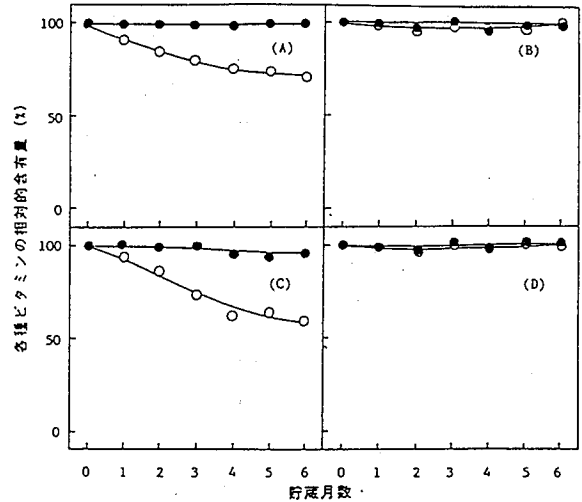


図 6 ユーグレナ細胞の貯蔵時における各種ビタミン含量の変動。  
A, ビタミンB<sub>12</sub>; B, ビタミンB<sub>2</sub>; C, ビタミンB<sub>6</sub>; D, ビタミンB<sub>12</sub>.  
●, -20°C; ○, 25°C.

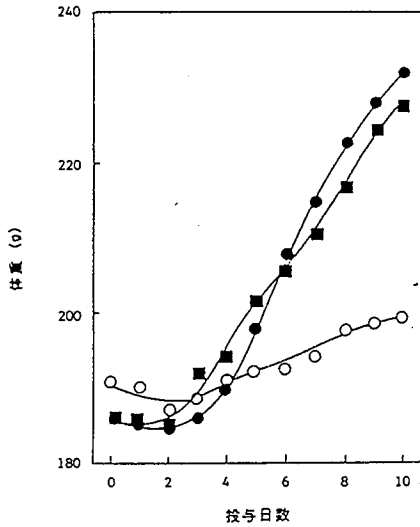


図 7 ビタミンA無給与ラットにおけるユーグレナ細胞投与の効果。  
●, β-カロテン給与食; ○, ビタミンA無給与食; ■, ユーグレナ食。

表 7 β-カロテン給与、無給与およびユーグレナ食投与ラットの体重増加と血清および肝臓中のレチノール含有量。

	体重増加 (g)	レチノール含有量	
		肝臓 (μg/g組織)	血清 (μg/100 ml)
β-カロテン	45.7±4.0	37.7±6.5	109.2±9.2
ユーグレナ	41.2±4.0	35.2±2.6	96.5±8.3
無添加	8.5±1.3	0.2±0.0	2.4±0.3

Mean ± SD (n=6).

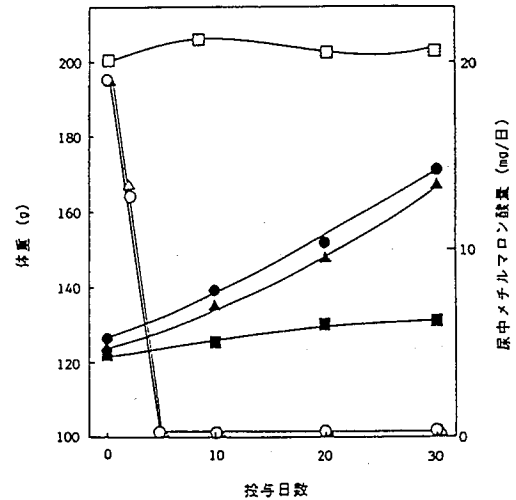


図 8 ビタミンB<sub>12</sub>無給与ラットにおけるユーグレナ細胞投与の効果。  
体重増加: ●, ビタミンB<sub>12</sub>給与食; ■, ビタミンB<sub>12</sub>無給与食;  
▲, ユーグレナ食。  
尿中メチルマロン酸: ○, ビタミンB<sub>12</sub>給与食; □, ビタミンB<sub>12</sub>無給与食;  
△, ユーグレナ食。

表 8 ビタミンB<sub>12</sub>給与、無給与およびユーグレナ食投与ラットの体重増加と血清および肝臓中のビタミンB<sub>12</sub>含有量。

	体重増加 (g)	ビタミンB <sub>12</sub> 含有量	
		肝臓 (ng/g組織)	血清 (ng/ml)
ビタミンB <sub>12</sub>	52.5±5.0	62.8±4.5	0.51±0.32
ユーグレナ	50.3±7.4	59.7±5.3	0.50±0.23
無添加	7.9±3.4	5.4±0.0	0.36±0.11

Mean ± SD (n=6).

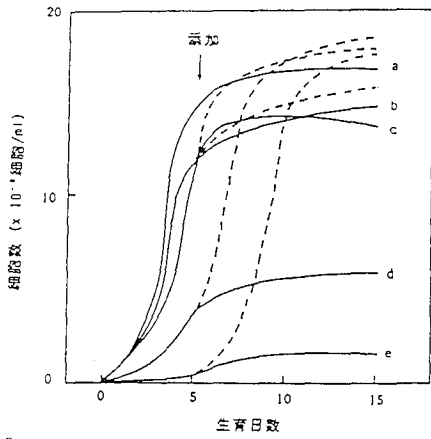


図9 各種無機イオン欠乏培地におけるユーグレナの生育曲線。  
 a. 正常; b. Fe欠乏; c. Mn欠乏; d. Zn欠乏; e. Mg欠乏。  
 生育5日目には各欠乏無機イオンを添加し、その後の生育を破線で示した。

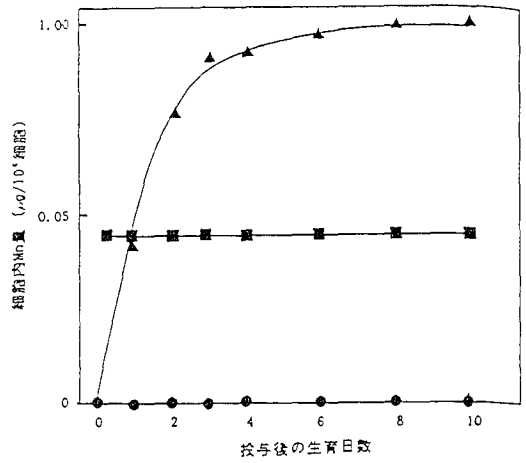


図10 Mn添加後のMn欠乏ユーグレナ細胞の生育と細胞内Mn含有量の変動。  
 ●, Mn欠乏細胞; ■, 正常細胞; ▲, Mn添加後の欠乏細胞。

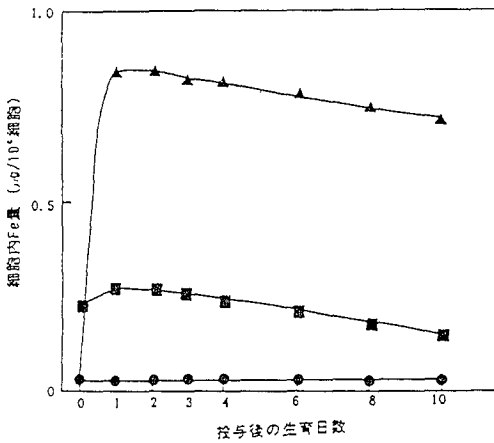


図11 Fe添加後のFe欠乏ユーグレナ細胞の生育と細胞内Fe含有量の変動。  
 ●, Fe欠乏細胞; ■, 正常細胞; ▲, Fe添加後の欠乏細胞。

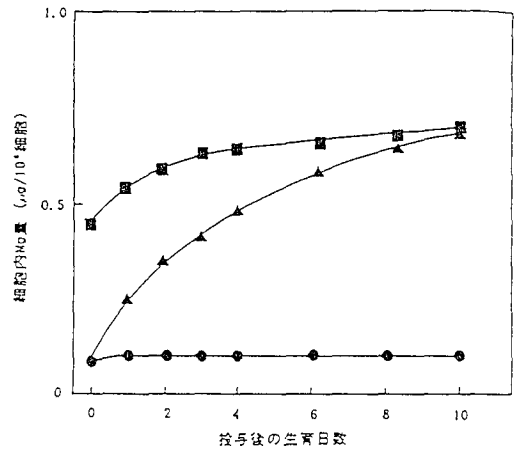


図12 Mg添加後のMg欠乏ユーグレナ細胞の生育と細胞内Mg含有量の変動。  
 ●, Mg欠乏細胞; ■, 正常細胞; ▲, Mg添加後の欠乏細胞。

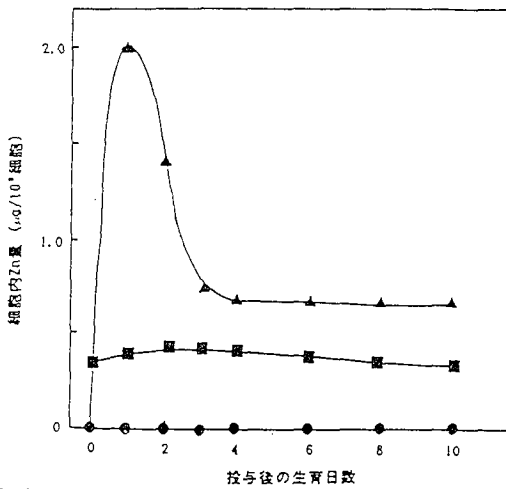


図13 Zn添加後のZn欠乏ユーグレナ細胞の生育と細胞内Zn含有量の変動。  
 ●, Zn欠乏細胞; ■, 正常細胞; ▲, Zn添加後の欠乏細胞。

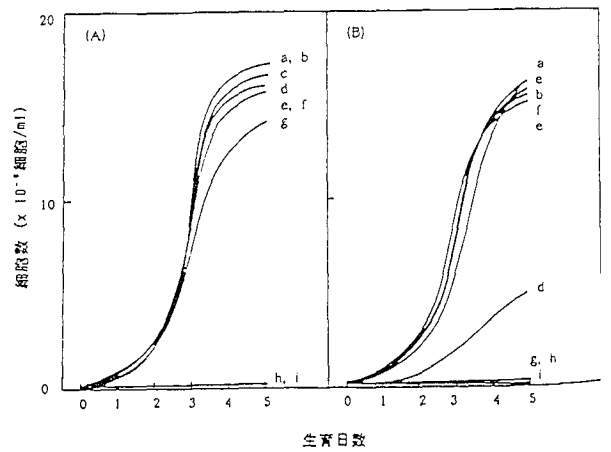


図14 各種無機イオン過剰培地でのユーグレナの生育曲線。  
 A. 10-倍過剰; B. 100-倍過剰。  
 a. 正常; b. Fe過剰; c. Mn過剰; d. Ca過剰; e. Zn過剰; f. Cu過剰;  
 g. Mo過剰; h. Co過剰; i. Ni過剰。

表9 無機イオン欠乏および過剰ユーグレナ細胞の各無機イオン含有量。

無機イオン	(ng/10 <sup>6</sup> 細胞)			
	正常細胞	欠乏細胞	過剰細胞	
			10-倍過剰	100-倍過剰
Zn	0.795	0.012	1.51	2.23
Mg	0.167	0.08	0.70	0.58
Fe	0.153	0.03	0.23	0.67
Mn	0.024	0	0.24	0.95
Ca	0.046	0	0.07	0.12
Cu	0.004	0	0.04	0.59
Ni	0.006	0	-	-

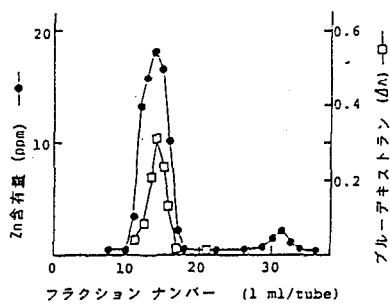


図15 セフアデックスG-15によるユーグレナ細胞内Znの溶出パターン

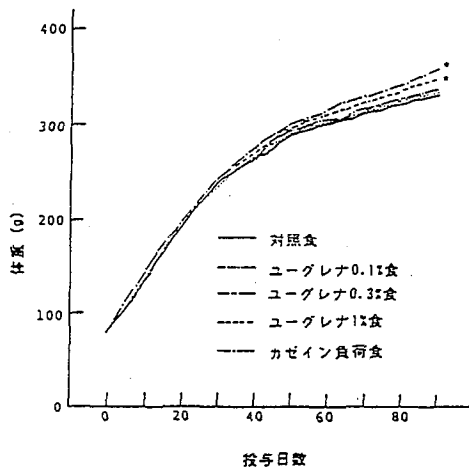


図16 ユーグレナおよびカゼイン食ラットの生育曲線。  
Mean ± SD. \*p<0.05.

表10 雄ラットの摂取排泄量に及ぼすユーグレナ細胞の影響。

	対照食	0.1%ユーグレナ食	0.3%ユーグレナ食	1%ユーグレナ食	カゼイン負荷食
食餌摂取量 (g)	12.7±2.1	13.1±2.1	16.5±2.6*	15.0±2.7*	13.6±3.9
水摂取量 (ml)	12.3±3.4	12.1±3.1	15.8±2.8**	16.5±3.0**	20.5±3.6**
尿 (ml)	0.66±0.34	0.82±0.35	1.46±0.45**	2.15±0.68**	2.41±0.55**
糞 (g)	5.8±1.4	6.4±1.9	6.9±1.9	9.1±1.9**	6.2±1.2

Mean ± SD.  
\*p<0.05; \*\*p<0.01.

表 11 雄ラットの各臓器の相対的質量.

	対照食	0.11ユーグレナ食	0.31ユーグレナ食	1ユーグレナ食	カゼイン負荷食
脳	0.600±0.083	0.589±0.040	0.562±0.049	0.569±0.134	0.591±0.103
心臓	0.346±0.020	0.325±0.030	0.312±0.022**	0.311±0.014**	0.321±0.055
肺	0.437±0.041	0.426±0.037	0.479±0.053	0.453±0.058	0.397±0.057
肝臓	3.424±0.208	3.322±0.327	3.330±0.245	3.262±0.117	3.534±0.252
腎臓	0.762±0.055	0.794±0.036	0.749±0.051	0.794±0.059	0.734±0.085
脾臓	0.214±0.027	0.200±0.025	0.190±0.011	0.213±0.017	0.214±0.031
胃	0.410±0.039	0.412±0.050	0.369±0.030**	0.385±0.020*	0.354±0.054*
小腸	1.372±0.215	1.507±0.310	1.513±0.266	1.329±0.167	1.349±0.327
大腸	0.565±0.104	0.499±0.077	0.513±0.079	0.530±0.047	—
精巣	0.907±0.057	0.879±0.119	0.870±0.069	0.881±0.039	0.882±0.147

これらの値は体重当たりのパーセントを示す.

Mean±SD.

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

表 12 雄ラットの血清学的分析値.

	対照食	ユーグレナ0.11食	ユーグレナ0.31食	ユーグレナ1食	カゼイン負荷食
白血球 (x 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.06±0.56	4.34±0.34	7.09±1.25**	6.44±1.27**	7.50±3.77**
赤血球 (x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	893.5±41.7	873.6±30.4	903.4±37.1	880.1±28.6	863.3±36.5
ヘモグロビン (g/dl)	14.62±0.79	15.20±0.05	15.94±0.75**	15.62±0.53**	15.13±0.52
ヘマトクリット (%)	46.37±2.41	47.77±2.43	48.59±2.84	48.17±3.21	52.20±2.52**
平均赤血球容積 (μ <sup>3</sup> )	53.00±1.90	54.89±2.02	54.20±1.33	54.70±1.35*	60.50±2.42**
平均赤血球色素量 (μg)	16.60±0.67	17.26±0.52	17.83±0.57**	17.58±0.29**	17.54±0.56**
平均赤血球色素濃度 (%)	31.53±0.32	31.85±0.12*	32.52±0.65**	32.41±0.42**	28.96±0.05**
血小板 (x 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	79.14±10.05	75.20±6.98	74.56±9.07	74.40±7.90	82.51±13.41
網状赤血球 (/1000)	9.10±2.54	0.56±2.45	0.10±2.21	10.25±2.05	10.30±1.79
好中球 (桿状核) (%)	1.11±0.31	2.25±1.48	1.00±0.70	5.90±3.67**	3.40±3.07
好中球 (分葉核) (%)	22.13±6.97	33.00±6.05*	26.22±6.36	37.67±7.70**	38.10±10.42**
好酸球 (%)	1.11±0.87	1.44±0.96	0.40±0.66	0.50±0.50	0.33±0.47*
好塩基性白血球 (%)	0	0	0.10±0.30	0	0
リンパ球 (%)	71.38±4.02	58.25±7.70**	66.78±8.42	49.14±7.24**	57.80±11.37**
単核白血球 (%)	2.50±1.58	2.30±1.11	4.00±2.28	3.11±1.20	3.01±1.21

Mean±SD.

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

表 13 雄ラット血清の生化学的解析値.

	対照食	0.11ユーグレナ食	0.31ユーグレナ食	1ユーグレナ食	カゼイン負荷食
βタンパク質 (g/dl)	5.63±0.48	5.58±0.23	5.80±0.28	5.57±0.28	6.31±0.21**
アルブミン (g/dl)	1.00±0.31	1.11±0.05	1.09±0.09	1.08±0.04	—
A/G比	0.240±0.008	0.249±0.008	0.230±0.018	0.239±0.007	—
βコレステロール (mg/dl)	65.0±10.04	54.9±7.44*	66.4±10.73	61.9±6.55	64.3±11.05
β-リポタンパク質 (mg/dl)	29.1±11.4	34.3±10.01	29.0±8.84	24.7±7.44	74.9±19.84**
TC (mg/dl)	61.1±28.69	67.9±14.91	79.7±28.23	40.0±5.93*	114.1±30.53**
GOT (R-F)	153.1±80.53	145.6±44.43	152.8±81.28	228.4±81.84	217.0±61.22
GPT (R-F)	32.3±11.32	28.5±3.01	30.0±9.32	26.9±5.59	34.7±11.01
ALP (K-U)	14.8±3.61	11.95±1.82*	14.30±2.33	13.60±2.02	18.76±4.36*
LAP (G-R)	92.7±18.30	78.5±13.6	68.0±16.58**	54.7±5.92**	62.9±4.53**
γ-GTP (mU/ml)	5.0±1.18	4.6±0.49	3.5±1.28*	3.9±0.54*	6.2±0.6*
コリンエステラーゼ (μmol)	2.14±0.25	1.87±0.25*	1.95±0.32	2.10±0.18	—
LDH (WRO)	668.8±439.2	404.7±143.3	705.8±469.8	654.3±374.9	1245.6±390.1
CPK (IU/L)	464.7±204.7	447.4±187.3	607.3±276.19	541.8±247.5	991.5±812.7
Na (mEq/l)	142.0±0.38	142.0±3.19	140.4±2.94	140.2±3.09	146.3±1.62
Ca (mg/dl)	9.57±1.33	9.67±0.50	8.82±0.47	8.68±0.27	9.47±0.64
Cl (mEq/l)	102.4±3.26	102.9±1.22	100.8±1.89	101.5±1.43	103.3±1.10
K (mEq/l)	5.45±0.79	5.14±0.60	5.45±0.38	5.47±0.42	7.07±0.865**
PI (mg/dl)	7.18±0.57	7.81±0.70	6.91±0.59	6.48±0.37**	7.58±0.75
Fe (μg/dl)	129.7±37.12	147.0±19.18	144.4±25.24	125.6±9.10	142.0±21.13
グルコース (mg/dl)	185.0±27.14	197.9±16.25	189.3±34.77	177.8±12.98	213.1±30.65
TST (S-H)	0.64±0.16	0.59±0.03	0.62±0.08	0.80±0.00**	—
ZTT (K-U)	0.23±0.16	0.25±0.10	0.21±0.13	0.42±0.12	—
βビリルビン (mg/dl)	0.22±0.08	0.19±0.05	0.23±0.05	0.26±0.08	0.48±0.14**
クレアチニン (mg/dl)	0.60±0.08	0.64±0.05	0.63±0.06	0.55±0.05	0.62±0.11
BUN (mg/dl)	17.7±2.87	17.3±2.00	19.5±3.47	23.1±1.81**	29.7±3.74**
尿酸 (mg/dl)	1.62±0.56	1.61±0.56	1.95±0.66	1.39±0.33	2.55±0.56**
NPN (mg/dl)	28.6±2.91	28.2±2.04	30.3±2.32	34.0±1.61**	51.50±7.57**
LDL-コレステロール (mg/dl)	59.14±6.42	51.80±7.44	54.40±7.48	52.40±12.74	44.78±5.39**
リン脂質 (mg/dl)	114.9±35.30	138.5±13.76	158.4±16.92**	138.0±11.97	117.0±40.56

Mean±SD.

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

表 14 雄ラット血清の生化学的分析値.

		対照食	ユーグレナ0.1%食	ユーグレナ0.3%食	ユーグレナ1%食	カゼイン負荷食
総タンパク質	(g/dl)	6.03±0.21	6.15±0.24	6.17±0.28	6.16±0.35	6.48±0.34**
アルブミン	(g/dl)	67.81±1.79	67.19±1.29	66.19±1.62	63.97±3.04**	69.05±1.06
A/G比		2.11±0.17	2.05±0.12	1.96±0.14	1.79±0.22**	2.24±0.11
総コレステロール	(mg/dl)	54.80±5.70	51.63±4.97	58.71±4.98	61.78±4.85*	56.50±4.64
β-リポタンパク質	(mg/dl)	97.60±19.48	125.88±57.91	75.29±17.31*	79.00±31.20	162.88±70.17*
TG	(mg/dl)	115.2±16.3	117.4±48.5	89.4±27.3*	90.2±27.6	158.4±52.5
GOT	(R-F)	113.0±28.8	112.7±24.5	103.1±16.3	116.4±24.6	155.8±37.5*
GPT	(R-F)	18.10±3.00	20.00±4.03	20.00±2.32	21.89±5.47	22.00±3.64*
AL-P	(K.U)	18.54±4.25	18.75±4.68	14.80±4.48	15.90±3.02	16.13±2.85
LAP	(G-R)	60.90±4.20	56.88±4.78	52.71±6.73*	58.67±8.50	55.13±4.34*
γ-GTP	(mU/ml)	4.70±1.19	4.48±1.11	2.57±1.59**	4.22±2.10	6.00±1.67**
コリンエステラーゼ	(μmol)	0.617±0.107	0.531±0.145	0.579±0.120	0.563±0.224	0.369±0.104**
LDH	(WRO)	632.7±180.5	792.3±161.3	738.4±347.8	950.4±525.3	1039.7±194.0**
CPK	(IU/L)	279.6±108.2	480.4±348.3	484.7±232.7*	362.3±169.5	501.9±203.2*
Na	(mEq/l)	141.7±2.19	142.4±1.73	143.0±3.30	141.1±4.50	145.1±1.62
Ca	(mg/dl)	4.62±0.31	4.50±0.21	4.66±0.21	4.42±0.18	4.80±0.13
Cl	(mEq/l)	101.7±1.35	103.9±1.83	102.6±1.29	103.4±21.83	104.3±1.58
K	(mEq/l)	6.05±0.57	6.46±0.42	6.59±0.48	6.97±0.77*	6.01±0.75
Pi	(mg/dl)	5.96±0.47	6.93±0.80**	6.46±0.41	6.61±0.60**	5.44±0.75
Fe	(μg/dl)	238.2±59.0	272.5±31.3	309.9±46.3*	280.1±86.8	386.9±62.2**
グルコース	(mg/dl)	172.1±14.1	176.3±9.70	196.6±14.0**	187.7±16.4	210.3±24.6
TBT	(S.H)	0.46±0.05	0.38±0.13	0.30±0.05**	0.34±0.08**	0.40±0.07
ZTT	(K.U)	1.42±0.09	1.33±0.08*	1.33±0.07	1.33±0.09	1.44±0.05
総ビリルビン	(mg/dl)	0.48±0.19	0.60±0.21	0.57±0.40	0.83±0.67	0.53±0.16
クレアチニン	(mg/dl)	0.59±0.03	0.64±0.05*	0.63±0.07	0.55±0.11	0.59±0.04
BUN	(mg/dl)	23.50±3.72	25.88±2.15	23.14±3.83	26.56±4.76	26.63±2.18
尿酸	(mg/dl)	1.34±0.26	1.46±0.33	1.57±0.65	2.20±1.15*	2.16±0.58**
NPN	(mg/dl)	43.00±4.40	46.50±2.92	41.80±1.47	45.25±6.04	46.00±2.69
HDL-コレステロール	(mg/dl)	41.10±4.59	41.25±3.38	50.14±3.09**	51.67±4.71**	32.86±2.53**
リン脂質	(mg/dl)	142.7±10.8	135.6±14.5	136.6±6.52	134.8±9.70	147.0±14.23

Mean ± SD.

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

表 15 雄ラット肝臓と腎臓の生化学的分析値.

臓器		対照食	ユーグレナ0.1%食	ユーグレナ0.3%食	ユーグレナ1%食	カゼイン負荷食
AL-P	(mU/mg prot.)	126.6±13.1	103.7±16.2**	101.5±24.2*	117.4±21.4	148.9±14.7**
GOT	(mU/mg prot.)	560.4±37.0	596.0±65.3	524.5±0.3**	524.3±0.7**	579.2±83.9
GPT	(mU/mg prot.)	8.08±1.207	7.476±0.459	8.003±1.050	7.692±0.540	11.110±1.358*
LAP	(mU/mg prot.)	29.92±5.48	29.32±6.53	25.96±5.58	33.19±4.42	34.21±10.03
γ-GTP	(mU/mg prot.)	1119.9±245.5	889.2±183.4*	865.6±227.4*	1081.5±169.3	1418.6±683.9
Pi	(μg/mg Kidney)	0.9524±0.0691	0.9961±0.1217	0.9944±0.1224	0.8998±0.3031	0.8366±0.1117
リン脂質	(μg/mg Kidney)	16.98±1.63	18.42±1.36	17.40±1.47	13.80±3.65*	—
総コレステロール	(μg/mg Kidney)	6.190±0.544	6.903±0.617*	6.349±0.734	4.924±1.250*	4.361±0.559*
HDL-コレステロール	(μg/mg Kidney)	5.028±0.762	5.272±0.825	4.290±0.892	2.986±0.826**	—
TG	(μg/mg Kidney)	7.629±2.523	8.510±3.217	8.359±1.773	12.589±7.580	6.469±0.856
β-リポタンパク質	(μg/mg Kidney)	2.296±0.624	2.002±0.735	2.229±0.210	2.067±0.306	4.171±0.707*
肝臓						
AL-P	(mU/mg prot.)	1.369±0.333	1.273±0.255	1.302±0.138	1.380±0.177	1.090±0.708
GOT	(mU/mg prot.)	471.0±54.7	559.2±53.2**	604.3±104.62**	622.8±71.8**	878.0±148.3**
GPT	(mU/mg prot.)	347.0±92.3	396.2±92.3	439.6±161.8	618.0±111.4**	570.4±113.4**
LAP	(mU/mg prot.)	3.918±1.039	5.057±0.807*	6.573±1.643**	6.380±0.955**	5.451±1.555*
γ-GTP	(mU/g prot.)	83.41±39.61	95.67±71.71	64.19±23.02	85.96±29.84	693.40±865.90
ニサンチンオキシダーゼ	(mU/g prot.)	428.9±353.1	265.5±98.6	462.5±183.8	915.0±267.5**	915.3±231.8**
Pi	(μg/mg liver)	0.7376±0.1324	0.8157±0.0720	0.8033±0.0919	0.7948±0.0778	0.8793±0.0775
リン脂質	(μg/mg liver)	16.75±3.08	15.87±2.49	15.20±1.27	16.95±5.42	8.54±3.35**
総コレステロール	(μg/mg liver)	4.032±0.485	4.301±2.49	4.039±0.350	3.966±1.246	3.746±0.629
HDL-コレステロール	(μg/mg liver)	2.487±0.231	2.339±0.265	2.271±0.289	2.195±0.297	3.549±1.744
TG	(μg/mg liver)	8.984±1.993	11.374±2.685	7.912±1.475	10.003±2.509	8.796±2.589
β-リポタンパク質	(μg/mg liver)	1.8522±0.5684	2.1983±0.4221	1.9551±0.5014	2.3265±0.5467	3.4250±0.5720*

Mean ± SD.

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

## 審査結果の要旨

これまでの栄養補助剤は主として化学合成によって得られたビタミン類と化学薬品としての無機塩類を混合して製造されている。化学薬品としてのビタミンと無機質の混合物は、この点自然食品に含まれているような生物学的に活性な形態と異なり、栄養素としての有効性にも問題がある可能性がある。

ユーグレナ (*Euglena gracilis*) はミドリムシ藻類に分類され、酵母・クロレラ・スプルリナなどにおける栄養蓄積に比べて、細胞膜が薄く、マイクロ栄養素の吸収が良く、またこれを摂取したときに消化性が良いことにおいて優れている。本研究は上述の論点から生体内に含有される形態でのビタミン類、無機質を豊富に含む栄養補助剤の製造を意図し、その材料としての原生動物のユーグレナを選び基礎的研究を行ったものである。

ユーグレナは種々の水溶性ビタミンのうちビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>12</sub>とニコチン酸を多量に細胞内に蓄積した。またビタミンC、E、β-カロチンなどは光照射と生合成前駆体の添加により、含量の増大が見られた。これらから培養条件を選ぶことにより、多量のビタミン類を含有するユーグレナ細胞の取得が達成された。

これらビタミンは細胞内では効率的に活性型に転換されて存在していた。この細胞を貯蔵すると-20℃ではビタミンは6ヶ月間すべて安定であったが、常温では一部ビタミンにLossが見られた。過剰の微量金属塩を加えることにより、多量の微量金属を含有するユーグレナ細胞を得ることができた。ユーグレナの亜急性毒性試験を行い、無害であることが認められた。

以上のようにユーグレナに多量のビタミンや微量金属を蓄積させる条件を見出し、栄養補助剤として優れていることを証明したことは食品産業的にも意義があり、農学博士の学位を授与する資格を有するものと判定した。