

ヒアルロン酸オリゴ糖の同時定量法開発にはじめて成功

～摂取したヒアルロン酸の体内動態解明への貢献に期待～

ポイント

- ・血漿（けっしょう）中ヒアルロン酸 4、6、8 糖の LC-MS/MS による同時定量法を開発。
- ・摂取したヒアルロン酸により、各ヒアルロン酸オリゴ糖血漿中濃度が増大することを確認。
- ・生体中濃度の解明により、濃度と効果の関連性を明らかにできる可能性を提示。

概要

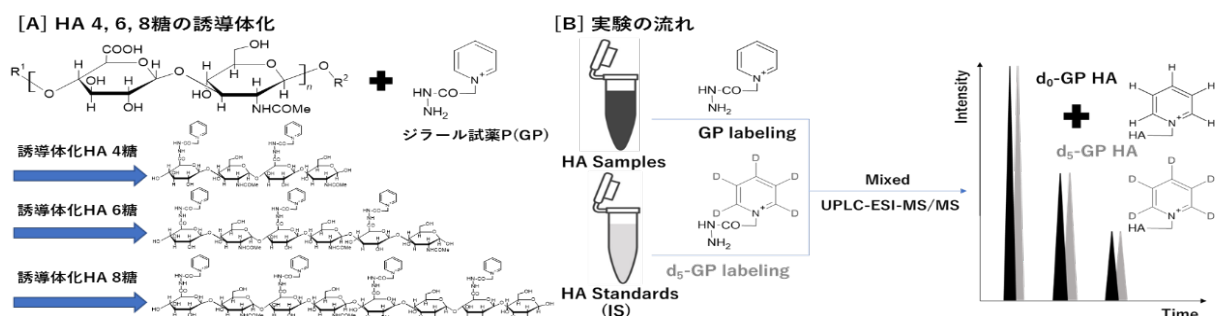
北海道大学大学院薬学研究院の菅原 満教授、佐藤夕紀講師、北海道大学大学院生命科学院修士課程（研究当時）の高林直央氏らの研究グループは、LC-MS/MS（液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法）により、血漿中の微量なヒアルロン酸オリゴ糖 4、6、8 糖を同時定量する方法を開発しました。

ヒアルロン酸は、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンから構成されるグリコサミノグリカンの一種で、生体での分子量は数千から数百万まで様々なサイズで存在しています。近年、ヒアルロン酸を経口摂取すると 8 糖程度まで腸内細菌により分解されて吸収されることが報告されましたが、各オリゴ糖の詳細な体内動態は不明な点が多いことが課題でした。そこで本研究では、血液中の微量なヒアルロン酸オリゴ糖を同時に定量できないかと考えました。

ヒアルロン酸を投与していないラットの血漿に標準物質を加え、縮合剤である DMT-MM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) -4-methylmorpholinium chloride) とジラル試薬 P を用いて、カルボン酸ヒドラジドへと誘導体化^{*1}し、固相抽出カラムを通して過剰な反応試薬や血漿中の夾雑物^{*2}除去後、測定に用いました。また、同様の手順により同位体ジラル試薬 P で誘導体化したヒアルロン酸オリゴ糖を内部標準物質^{*3}としました。ヒアルロン酸 4、6、8 糖それぞれの特異的な基準ピークが確認され、その検量線には良好な直線性が認められたため、バリデーション試験で本条件の堅牢性を確認しました。また、本方法により、ラットへ経口投与した際のヒアルロン酸 4、6、8 糖の血漿中濃度を測定することに成功しました。

これらの結果は、将来的にヒトがヒアルロン酸を摂取したときの体内動態の解明、ヒアルロン酸オリゴ糖の生体内での機能解明、効果的な製剤開発などにつながることを期待されます。

なお、本研究成果は、2026 年 4 月 24 日（金）公開の Food Research International 誌にオンライン掲載されました。



本研究の概念図

【背景】

ヒアルロン酸は、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンから構成されるグリコサミノグリカン的一种で、生体内での分子量は幅広いサイズ（数千～数百万）で存在しています。その生体内での作用は多岐にわたり、医薬品や化粧品だけでなく、食品や食品添加物として使用されるなど幅広い分野で注目されています。食品などで経口的に摂取した場合の体内動態は不明な点が多かったものの、摂取したヒアルロン酸のサイズに関わらず、腸内細菌で8糖以下のオリゴ糖に分解され、吸収されることが報告されました（Šimek M et al., *Carbohydr Polym* 313; 120880 (2023))。生体内のヒアルロン酸の定量には、これまで様々な方法が用いられていますが、操作が簡便な ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法では10糖以上の分子にしか反応せず、HPLC (high performance liquid chromatography) 法では各オリゴ糖を2糖まで酵素分解して個別に測定されています。しかし、HPLC 法でも感度が十分ではないことが課題でした。そこで菅原教授らの研究グループは、8糖以下のヒアルロン酸オリゴ糖を簡便な前処理で、微量な濃度を測定できるような高い感度で、同時に検出する方法の開発に着手しました。

【研究手法】

本研究では簡便な前処理法として、マトリクス中のヒアルロン酸オリゴ糖を DMT-MM (4- (4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) -4-methylmorpholinium chloride) とジラル試薬 P で誘導体化し、カルボン酸ヒドラジドを形成させました。この誘導体化ヒアルロン酸オリゴ糖について、親水系相互作用を利用した固相抽出カラムで前処理後、限外ろ過カラムを通したろ液をサンプルとしました。また、同位体ジラル試薬 P を用いて同様に誘導体化したヒアルロン酸オリゴ糖が内部標準物質となり得るかどうかを確認しました。これらをペンタブロモベンジル基結合型カラムにより分離して、質量分析によりピークを検出しました。また、それぞれに特異的なピークを確認した後、日本臨床化学会のガイドラインに沿ってバリデーション試験を行い、本定量法の妥当性並びに堅牢性を確認しました。その後、Wistar ラットへ、市販のヒアルロン酸製剤（平均分子量 2000 Da）を 400 mg/kg で経口投与し、経時的に血液サンプルを得て、開発した方法により定量し、血漿中濃度を算出しました。

【研究成果】

誘導体化ヒアルロン酸 2、4、6、8 糖のクロマトグラムを確認したところ、4、6、8 糖では保持時間約 3 分に、2 糖は約 1 分にそれぞれ特異的でシャープなピークが確認されました（図 1）。また同位体ジラル試薬 P で誘導体化したヒアルロン酸の基準ピークイオンは、ジラル試薬 P で誘導体化したヒアルロン酸のクロマトグラムにおいて確認されなかったことから、内部標準物質として使用できることが示されました。さらに、本法により、2 糖以外のヒアルロン酸 4、6、8 糖についてそれぞれ 5-600 nM で良好な直線性 ($r^2=0.990$ 以上) の検量線が作成されました。この定量法についてバリデーション試験を行い、堅牢性と妥当性も確認されたことから、ヒアルロン酸 4、6、8 糖を同時定量できることが示されました。さらに、Wistar ラットへ市販のヒアルロン酸製剤を経口投与し、経時的に採取した血液を用いて本方法により血漿中濃度を測定したところ、投与約 1 時間後にヒアルロン酸 4、6、8 糖それぞれのピークが認められ、約 12 時間後までに消失していることが確認されました（図 2）。

【今後への期待】

今回は、実験動物へ市販のヒアルロン酸製剤を投与した研究内容です。これらの製剤にどの程度ヒ

アルロン酸 4、6、8 糖が含まれているのかを明らかにし、各オリゴ糖を経口投与することで、ヒアルロン酸経口投与後の体内動態をより詳細に明らかにできると考えています。また、今後はヒトの血漿中ヒアルロン酸オリゴ糖の測定に適用し、作用に関する検討結果と併せて考察することで、より効率的な製剤開発、科学的根拠に基づくヒアルロン酸の効果的な利用につながることを期待されます。

【謝辞】

本研究は公益財団法人日本食品化学研究振興財団、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター、JSPS 科研費 JP23K06207 の助成を受けたものです。

論文情報

論文名 Development of a method of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for simultaneous determination of hyaluronan in plasma. (血漿中ヒアルロン酸オリゴ糖の液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析による同時定量法の確立)
著者名 高林直央¹、佐藤夕紀²、青柳空馬³、梨本俊亮²、柏木 仁²、武隈 洋⁴、菅原 満^{2,4} (¹北海道大学大学院生命科学院、²北海道大学大学院薬学研究院、³北海道大学薬学部、⁴北海道大学病院薬剤部)
雑誌名 Food Research International (食品科学の専門誌)
DOI 10.1016/j.foodres.2026.119273
公表日 2026 年 4 月 24 日 (金) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 講師 佐藤夕紀 (さとう ゆき)

T E L 011-706-3977 F A X 011-706-4984 メール yukis@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/doutai/index.html>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

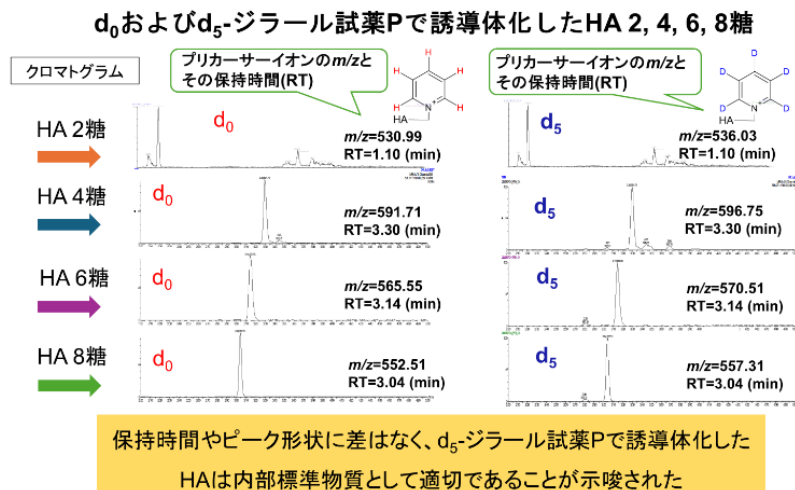


図 1. ジラール試薬 P と同位体ジラール試薬 P で誘導体化したときのヒアルロン酸 2、4、6、8 糖のクロマトグラム

Wistarラットへヒアルロン酸製剤を経口投与したときの血漿中濃度推移

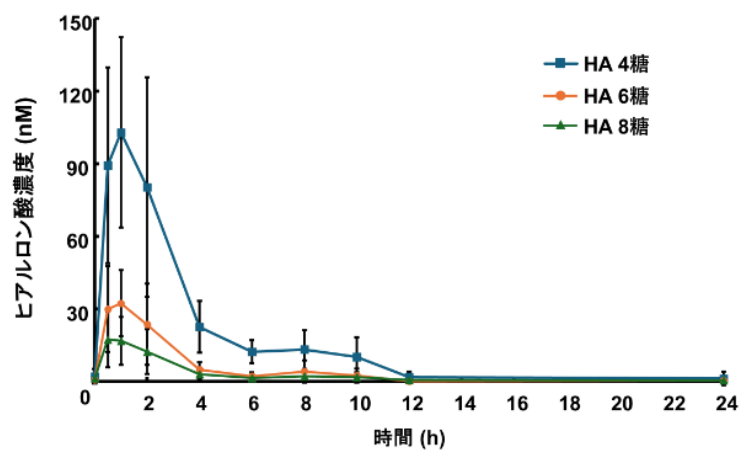


図 2. Wistar ラットへ市販ヒアルロン酸製剤（平均分子量 2000 Da）を経口投与したときの血漿中濃度推移

【用語解説】

- * 1 誘導体化 … 分析対象物質（ヒアルロン酸オリゴ糖）をある化学反応でその物質の一部の構造を変換（誘導体）させる（測定しやすい物質に変換する）こと。
- * 2 夾雑物 … 目的の成分以外に試料中に混入している不要な成分などのこと。
- * 3 内部標準物質 … 正確に定量するために、分析前に試料に一定量添加する目的成分と性質がよく似た既知の物質のこと。試料調製や LC への注入量、MS のイオン化効率のばらつきなどを補正するために用いられる。