

## フコイダン前投与により誘導される虚血肢の 血管新生作用に関する研究

- <sup>1)</sup> 鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生医科学専攻  
遺伝子再生医療学講座 再生医療学部門 (主任教授: 久留一郎)  
<sup>2)</sup> 山陰労災病院 内科  
<sup>3)</sup> 鳥取大学医学部附属病院 形成外科 (科長: 八木俊路朗)

野津智美<sup>1)</sup>, 櫻木哲詩<sup>2)</sup>, 陶山淑子<sup>3)</sup>, 八木俊路朗<sup>3)</sup>, 久留一郎<sup>1)</sup>

### Study on the neovascularization of limb ischemia induced by pretreatment with fucoidan

Tomomi NOTSU<sup>1)</sup>, Tetsushi SAKURAGI<sup>2)</sup>, Yoshiko SUYAMA<sup>3)</sup>,  
Shunjiro YAGI<sup>3)</sup>, Ichiro HISATOME<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Division of Regenerative Medicine and Therapeutics, Department of Genetic Medicine and Regenerative Therapeutics, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan*

<sup>2)</sup> *Department of Medicine, Sanin Rosai Hospital, Yonago, Japan*

<sup>3)</sup> *Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan*

#### ABSTRACT

【Background】 Peripheral artery disease (PAD) caused the poor prognosis of the patients. The life style intervention is necessary to protect patients from PAD. Fucoidan is the member of the polysaccharide originated from Mozuku sea weed, which is useful supplement for life style related disease. 【Purpose】 We examined whether fucoidan could improve limb ischemic lesions in mice and rats. 【Method and Result】 We created the ischemic limb model of mice and rats and evaluated their blood flow using the laser Doppler blood perfusion. We separated them into three groups, control group (without any treatment), post-treatment group (treated with fucoidan after ischemia for 4 weeks), and pre- and post-treatment group (treated with fucoidan before ischemia for 1 week and after ischemia for 4 weeks). Fucoidan significantly improved the blood perfusion of ischemic limb in pre- and post-treatment group compared to those in control group. Neovascularization was remarkably increased in muscle of ischemic limb in pre- and post-treatment group compared to those in control group. Fucoidan did not improve either the blood perfusion or neovascularization in post-treatment group. 【Conclusion】 Pretreatment with fucoidan through oral administration would be a promising supplement for protection from PAD.

(Accepted on February 21, 2018)

**Key words :** fucoidan, PAD, neovascularization

## はじめに

閉塞性動脈硬化症 (ASO) やバージャー病は、血管の炎症や動脈硬化のために血管が閉塞し血流が低下することにより、下肢の壊死が起こる疾患であり、末梢動脈疾患 (PAD) と呼ばれる。その重症度分類であるFontaine分類から、I度は無症状、II度は間歇性跛行、III度は安静時疼痛、IV度は皮膚潰瘍を伴うとされている。

海外の複数の調査によると、無症状の対象におけるPADの総有病率は3~10%であるのに対し、70歳以上では15~20%と無症状のPADは高齢者において増加する<sup>1)</sup>。米国民健康栄養調査によると、足関節上腕収縮期血圧比 (ABI) が0.90以下のPADの有病率は50~59歳の年齢層では2.5%、60~69歳では4.7%、70歳以上では14.5%と加齢と共に増加する<sup>1)</sup>。加えて、PAD患者は生活習慣病等の血管リスクファクターを有する場合が多く、リスクファクターを有する集団の29%にPADを認めるという報告があり、加齢とならび生活習慣病に合併してPADの頻度は増加する<sup>2)</sup>。また喫煙もPADの重要な危険因子である<sup>3)</sup>。間歇性跛行は新規にPADと診断された5.5%に、既に診断されているPADの12.5%に認められるが、PADはその75%が無症候性である<sup>4)</sup>。また、PADは動脈硬化性疾患であるために、脳血管疾患や冠動脈疾患に高頻度に合併する。実際にPADの56.4%に冠動脈疾患が、33.3%に脳血管疾患が合併し、20.3%は3疾患が合併するために、PAD患者の予後は不良である<sup>5)</sup>。

本治療には薬物治療が主体となっており、効果の無い場合は外科的なバイパス手術が用いられるが、外科的な治療が奏効しない場合は下肢の切断を余儀なくされる。2003年から外科手術が適応とならない患者に対し幹細胞を用いた血管新生療法も試みられているが、高額であることや手術侵襲があることから普及はしていない。PADの予防には生活習慣病の改善が重要であり、生活習慣病の予防のために近年サプリメントが普及してきている。

フコイダンはモズク由来の多糖体であり、抗癌作用等の効能が知られている<sup>6)</sup>。フコイダンによる下肢虚血の改善や血管新生の促進作用が報告され

ているが、その詳細は明らかではない<sup>7)</sup>。我々はこれまでに下肢虚血モデル動物を作製し、血管新生能を有する物質を探索してきたが<sup>8)</sup>、本研究では既報の動物モデルを用いてフコイダンの血管新生促進による後肢虚血改善効果を見出したので報告する。

## 材料および方法

本研究における実験動物の飼育、取り扱い及び実験計画書は、鳥取大学医学部動物実験指針に基づき、鳥取大学医学部動物実験委員会の指導と承認を得て行った。また、全ての生理学的及び病理学的解析は、各群を知らされていない熟練した研究者により行われた。

### 下肢虚血モデル作製

実験動物は雄性Wistarラット (8~10週齢、日本クレア、東京)、および雄性BALB/cAJcl-nu/nuマウス (8~10週齢、日本クレア、東京) を用いた。ラットならびにマウスにケタミン (80 mg/kg、三共、東京)、キシラジン (5 mg/kg、バイエル、東京) を腹腔内に投与し全身麻酔及び鎮痛処置を施した後、右後肢の大腿動脈を8-0絹糸で1ヶ所結紮して片側下肢虚血モデルを作製した。

### フコイダンの投与方法

図1に示すプロトコールに従い、フコイダン未投与群 (コントロール群)、虚血作製直後から4週間フコイダン5%を投与した群 (虚血後投与群)、ならびにフコイダン1%を虚血前1週間投与し、虚血作製直後から4週間フコイダン5%を投与した群 (虚血前後投与群) の3群を作製した。コントロール群には、市販のマウス用粉末飼料 (MF、オリエンタル酵母工業、東京) を与えた。フコイダンの投与は、フコイダン含有飼料を給餌することにより行った。フコイダン1%含有飼料は、マウス用粉末飼料99 gに粉末フコイダン (海産物のきむらやより供与) 1 gを混和し調整した。フコイダン5%含有飼料は、マウス用粉末飼料95 gに粉末フコイダン5 gを混和し調整した。

## 後肢虚血とフコイダン投与プロトコール：3群比較

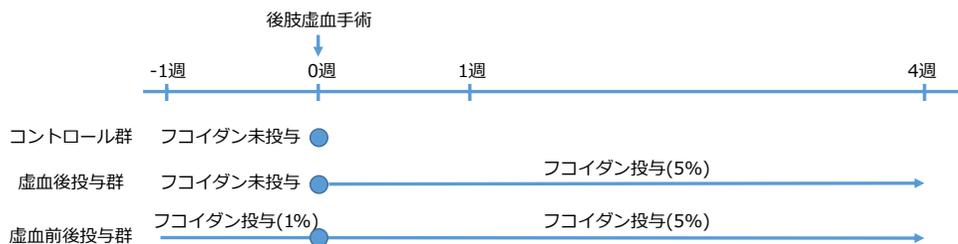


図1 後肢虚血作製とフコイダン投与プロトコール

コントロール群：フコイダン未投与，虚血後投与群：虚血作製直後から4週間フコイダン5%を投与，虚血前後投与群：フコイダン1%を虚血前1週間投与し，虚血作製直後から4週間フコイダン5%を投与

## 血流測定

虚血手術直後，術後1週目，4週目に，レーザードップラー血流計 (PERIMED, Stockholm, Sweden) を用い，各群の血流測定を行った。レーザードップラー血流計による測定は対側肢（非虚血肢）血流の平均値を1.0として，虚血肢血流を相対的に評価した。

## 骨格筋毛細血管密度の計測

マウスの後肢虚血作製4週間後に，虚血肢内転筋組織を凍結組織切片作製用包埋剤（ティシュー・テック O.C.T. コンパウンド，サクラファインテックジャパン，東京）に包埋し，液体窒素で凍結した。各群の組織片から凍結横断切片（8  $\mu\text{m}$  thick）を作製した後，内皮細胞マーカーであるCD31特異抗体（BD Biosciences）を用いて染色し，毛細血管数を計測した。毛細血管密度は，骨格筋線維に対して正規化して算出した。

## 統計解析

得られた各種データは，群毎に平均値  $\pm$  標準誤差で示した。各群の統計的有意差の検定には，解析ソフトウェアR（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; version 3.1.1）を用い，血流回復率の解析には，反復測定分散分析（repeated measures ANOVA）を，毛細血管密度の解析には，一元配置分散分析（One-way ANOVA）をそれぞれ用いた。p < 0.05の場合に統計的に有意な差があると判断した。

## 結果

## フコイダンの虚血後投与ならびに虚血前後投与がマウス後肢虚血に及ぼす効果

マウス下肢虚血モデルを用いてフコイダンの虚血後投与ならびに前後投与の効果を検討した。図2a, bは虚血作製4週間後にレーザードップラー血流計によりマウス骨格筋の血流を測定した時の虚血肢の血流の変化を示す。コントロール（図2a）は大腿動脈結紮により作製した虚血側の血流が低下しているが，フコイダン虚血前後投与（図2b）では顕著に改善している。図2cは虚血肢血流の経時的な改善を健側と比較したものである。コントロール群を含むすべての群において，虚血後の血流は経時的に改善した。なかでも，フコイダンを虚血前後投与したマウスの虚血肢の血流は，コントロールに比較して有意に改善した。一方，フコイダン虚血後投与群の虚血改善率はコントロールと差が認められなかった。以上の結果から，フコイダンの虚血前後投与は虚血肢の血流を有意に改善することが示された。

## フコイダンの虚血後投与ならびに前後投与がマウス虚血肢の毛細血管密度に及ぼす効果

フコイダによる虚血肢の血流改善効果が，骨格筋組織内の毛細血管の増加を伴うか否かについて検討した。図3は虚血作製4週間後の骨格筋組織のCD31陽性細胞を示す。コントロール（図3a）に比較して，フコイダン虚血前後投与マウス（図3b）では虚血肢の骨格筋組織内の毛細血管の増加が認められた。図3cは多数例における検討を示す

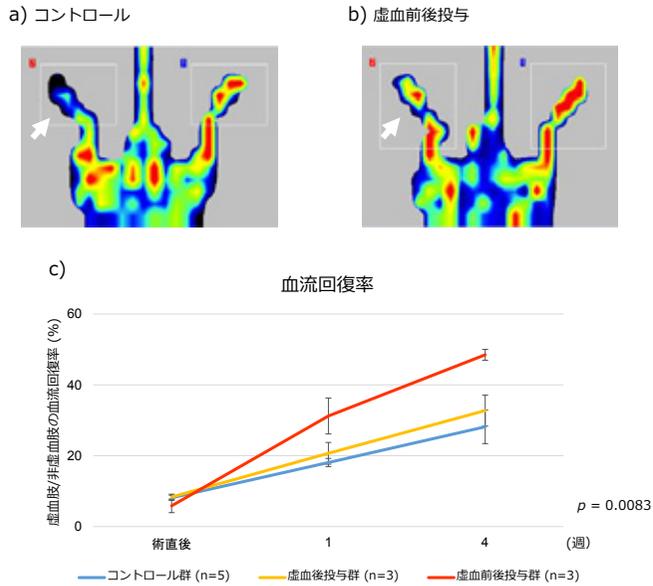


図2 フコイダンのマウス虚血肢血流回復に及ぼす効果

- a: フコイダン未投与コントロールマウスの虚血作製4週間後のレーザー Doppler による血流分布の代表例 (矢印: 虚血肢)
- b: フコイダン前後投与マウスの虚血作製4週間後のレーザー Doppler による血流分布の代表例 (矢印: 虚血肢)
- c: フコイダン未投与コントロール群とフコイダン虚血後投与群ならびに虚血前後投与群の多数例における経時的虚血肢血流回復率

が、フコイダン虚血前後投与群の毛細血管数はコントロール群に比較して有意に増加した。一方で、フコイダン虚血後投与群では増加が認められなかった。以上の結果から、フコイダンの虚血前後投与は虚血肢の毛細血管密度を有意に増加することが示された。

### フコイダンの虚血後投与ならびに前後投与がラット後肢虚血に及ぼす効果

フコイダンの虚血改善作用に種差が関与するかどうかを検討するため、ラットの下肢虚血モデルを作製し、フコイダンの虚血後投与ならびに前後投与が血流に及ぼす効果についてレーザー Doppler 血流計を用いて評価した。図4a, bは後肢虚血作製4週間後にレーザー Doppler 血流計により骨格筋の血流を測定した時の血流の変化を示す。コントロール (図4a) は大腿動脈結紮により作製した虚血側の血流が低下しているが、フコイダン虚血前後投与ラット (図4b) では顕著に改善している。図4cは虚血肢の経時的な改善を健側と比較し

たものである。コントロール群を含むすべての群において虚血後の血流は経時的に改善を示した。なかでも、フコイダンを虚血前後投与したラットの後肢虚血はコントロールに比較して有意に改善した。一方、虚血後のみのフコイダンの投与は、虚血前後投与した群に比して血流改善の程度が低い。以上の結果から、フコイダンの虚血前後投与は種差に関わらず虚血肢の血流を有意に改善することが示された。

### 考 察

本研究ではラットならびにマウス下肢虚血モデルを用いて、フコイダンの効果を検討し、①フコイダンの虚血前後投与は、マウス及びラットの後肢虚血を改善する、②フコイダンの虚血前後投与は、マウスの虚血肢骨格筋毛細血管密度を増加する、③フコイダンの虚血後投与は、マウスならびにラットの虚血肢の血流を改善しないことが判明した。

ASOやバージャー病を含むPADは動脈硬化に

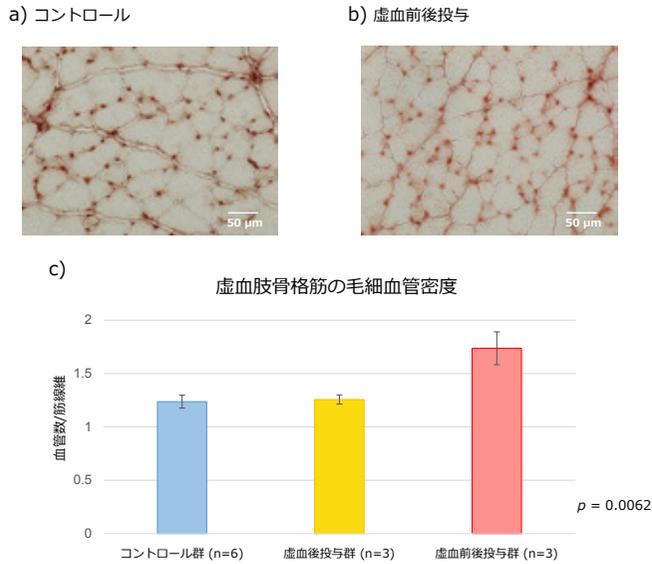


図3 フコイダンのマウス虚血肢骨格筋の毛細血管密度に及ぼす効果

- a: フコイダン未投与コントロールマウスの虚血作製4週間後の骨格筋切片画像の代表例  
 b: フコイダン前後投与マウスの虚血作製4週間後の骨格筋切片画像の代表例  
 c: フコイダン未投与コントロール群とフコイダン虚血後投与群ならびに虚血前後投与群の多数例における虚血作製4週間後の虚血肢毛細血管密度

よる血管障害であるが、加齢ならびに生活習慣病の集積により発症してくる<sup>1)</sup>。特に喫煙はパージャー病のリスクであり、高血圧や糖尿病患者ではASOが高頻度に合併する<sup>2)</sup>。そのためPADの予防として、禁煙・減量、脂質異常症・糖尿病ならびに高血圧の治療が勧められる。PADの標準的な治療法は、間歇性跛行に対しては、運動療法と薬物療法が二本柱となっている<sup>9)</sup>。運動療法では、血管内皮機能の改善や骨格筋の血管数の増加が知られている<sup>9)</sup>。薬物療法としてはシロスタゾール<sup>10)</sup> やアスピリン<sup>11)</sup>、及びチクロピジン<sup>12)</sup> やクロピドグレル<sup>12)</sup>、サルボグレラート<sup>13)</sup>、プロスタグランジン<sup>14)</sup> 等の抗血栓薬、イコサペント酸エチル<sup>15)</sup> やアルガトロバン<sup>16)</sup>、ならびに脂質低下薬が使用される。これらの保存的な治療では症状の改善傾向がなく生活に大きな支障を生じている場合は、血行再建術が考慮される。

虚血性難治性潰瘍に対する先端医療として、HGF、VEGF、FGFによる遺伝子治療や自己骨髄単核球細胞移植、末梢血単核球細胞移植がいくつかの施設で行われているが、研究段階の医療である。HGF遺伝子治療<sup>17)</sup> と自己骨髄単核球細胞移植

に関しては、我が国における臨床試験で有効性が報告された<sup>18)</sup>。細胞移植療法による再生医療は、従来の治療法では効果の見込めなかった疾患に対する新しい選択肢として、近年その重要性を高めている。骨髄幹細胞、特にCD31陽性細胞は血管内皮前駆細胞であるために血管新生に有効であると考えられている。また、血管新生関連因子VEGF、HGF、FGF-2を分泌することが血管新生の機序の一つと考えられている<sup>19)</sup>。

フコイダンは、硫酸化多糖体の一種でコンブやワカメ、モズクなど褐藻類の粘質物に多く含まれる水溶性食物繊維である。主にL-フコースが数十から数十万個も繋がった高分子化合物で、平均分子量は約20万である。グルクロン酸を含むU-フコイダン、硫酸化フコースだけからなるF-フコイダン、ガラクトースを含むG-フコイダンなどに分類される。フコイダンは、硫酸基の含量や分子の大きさによりさまざまな生理活性をもつと考えられている。これまでの基礎研究からフコイダンには、抗菌作用<sup>20)</sup>、抗ウイルス作用<sup>21)</sup>、抗凝固作用<sup>22)</sup>、抗酸化作用<sup>23)</sup>、抗炎症作用<sup>24)</sup>、免疫修飾作用<sup>25)</sup>、アポトーシス誘導による抗癌作用等があることが報告

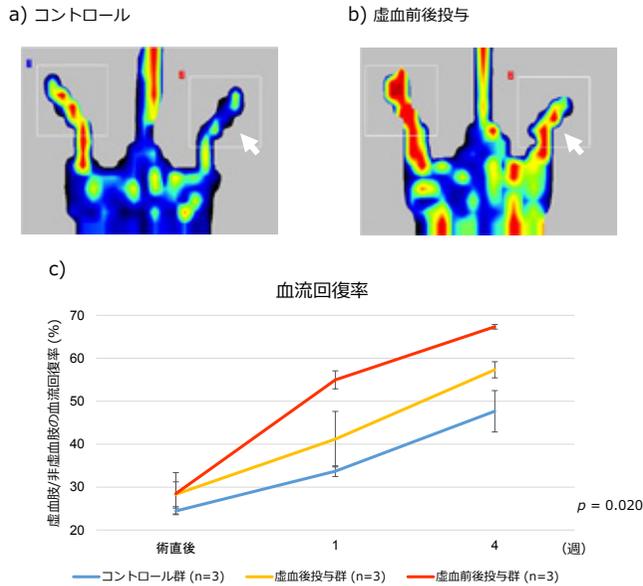


図4 フコイダンのラット虚血肢血流回復に及ぼす効果

- a: フコイダン未投与コントロールラットの虚血作製4週間後のレーザードップラーによる血流分布の代表例 (矢印: 虚血肢)
- b: フコイダン前後投与ラットの虚血作製4週間後のレーザードップラーによる血流分布の代表例 (矢印: 虚血肢)
- c: フコイダン未投与コントロール群とフコイダン虚血後投与群ならびに虚血前後投与群の多数例における経時的虚血肢血流回復率

されている<sup>26)</sup>。

本研究では、フコイダンを虚血前後投与すると、下肢虚血モデルにおいて血流の改善効果が有意に促進され、その効果の一部に毛細血管新生の促進が関与することが示唆された。この効果はフコイダンを予防的に投与できれば、PADに罹患した場合でも、血管新生効果により下肢虚血を軽減できる可能性を示す。近年、ラットの糖尿病PADモデルを用いた低分子フコイダンに関する研究が報告された。糖尿病PADラットの骨格筋では、VEGFの発現低下とeNOSのリン酸化が低下し、一方でICAM-1とIL-1βの発現が増加している。低分子フコイダンは抗炎症作用とeNOS/NO経路を活性化させ、VEGFの発現を増加させることで糖尿病PADラットの骨格筋の血管を増加させ、潰瘍・間歇性跛行を抑制するが、この作用は初期の抗血栓作用と後期の血管内皮と血管平滑筋の遊走促進による血管新生作用に起因するとされている<sup>27)</sup>。我々の検討では、フコイダンが虚血肢の血流を改善するためにはその前後投与が必要であり、虚血

後のみの投与では効果が認められなかった。この事実にはフコイダンには血管新生作用があるとしても、虚血後にはその効果は限定的であると考えられる。一方で、血管網は血管閉塞後の組織虚血に重要な役割を演じるが<sup>28)</sup>、VEGFは側副血路の形成過程を促進し、さらに血管内皮細胞の動員を促進することが示されており<sup>29)</sup>、この報告は、本研究で認められたフコイダンの前後投与による虚血肢の血流改善効果を説明できるかもしれない。

以上の考察から、フコイダンは虚血を発症する以前から投与されることが重要であることが分かる。フコイダンは機能性食品として種々の疾病を予防するサプリメントとして期待されているが、本研究からもフコイダンがPADを予防する機能性食品となりうることを示唆された。

### 結 語

フコイダンの虚血前後投与は、虚血肢の骨格筋毛細血管密度を増加することにより血流を改善する。

稿を終えるにあたり、実験の補助を行っていただいた井上裕美子氏ならびにフコイダンをご供与いただきました海産物のきむらやに感謝いたします。

## 文 献

- 1) Selvin, E., and Erlinger, T.P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation* 2004; **110**: 738-743.
- 2) Bundó, M., Aubà, J., Vallés, R., Torner, O., Pérez, A.M., and Massons, J. Peripheral arteriopathy in type 2 diabetes mellitus. *Aten Primaria* 1998; **22**: 5-11.
- 3) Planas, A., Clará, A., Marrugat, J., Pou, J.M., Gasol, A., de Moner, A., Contreras, C., and Vidal-Barraquer, F. Age at onset of smoking is an independent risk factor in peripheral artery disease development. *J Vasc Surg* 2002; **35**: 506-509.
- 4) Regensteiner, J.G., Hiatt, W.R., Coll, J.R., Criqui, M.H., Treat-Jacobson, D., McDermott, M.M., and Hirsch, A.T. The impact of peripheral arterial disease on health-related quality of life in the Peripheral Arterial Disease Awareness, Risk, and Treatment: New Resources for Survival (PARTNERS) Program. *Vasc Med* 2008; **13**: 15-24.
- 5) Aronow, W.S., Ahn, C., and Gutstein, H. Prevalence and incidence of cardiovascular disease in 1160 older men and 2464 older women in a long-term health care facility. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; **57**: M45-46.
- 6) Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., and Kim, S.K. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int J Biol Macromol* 2013; **60**: 366-374.
- 7) Luyt, C.E., Meddahi-Pellé, A., Ho-Tin-Noe, B., Collic-Jouault, S., Guezennec, J., Louedec, L., Prats, H., Jacob, M.P., Osborne-Pellegrin, M., Letourneur, D., and Michel, J.B. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **305**: 24-30.
- 8) Tanaka, K., Yamamoto, Y., Tsujimoto, S., Uozumi, N., Kita, Y., Yoshida, A., Shimizu, T., and Hisatome, I. The cyclooxygenase-2 selective inhibitor, etodolac, but not aspirin reduces neovascularization in a murine ischemic hind limb model. *Eur J Pharmacol* 2010; **627**: 223-228.
- 9) Hiatt, W.R., Wolfel, E.E., Meier, R.H., and Regensteiner, J.G. Superiority of treadmill walking exercise versus strength training for patients with peripheral arterial disease. Implications for the mechanism of the training response. *Circulation* 1994; **90**: 1866-1874.
- 10) Regensteiner, J.G., Ware, J.E., McCarthy, W.J., Zhang, P., Forbes, W.P., Heckman, J., and Hiatt, W.R. Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 2002; **50**: 1939-1946.
- 11) Tangelder, M.J., Lawson, J.A., Algra, A., and Eikelboom, B.C. Systematic review of randomized controlled trials of aspirin and oral anticoagulants in the prevention of graft occlusion and ischemic events after infrainguinal bypass surgery. *J Vasc Surg* 1999; **30**: 701-709.
- 12) Girolami, B., Bernardi, E., Prins, M.H., ten Cate, J.W., Prandoni, P., Simioni, P., Andreozzi, G.M., Girolami, A., and Büller, H.R. Antiplatelet therapy and other interventions after revascularisation procedures in patients with peripheral arterial disease: a meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; **19**: 370-380.
- 13) Matsuo, H., and Shigematsu, H. Effects of the 5-HT<sub>2A</sub> Antagonist Sarpogrelate

- on Walking Ability in Patients with Intermittent Claudication as Measured Using the Walking Impairment Questionnaire. *Ann Vasc Dis* 2008; **1**: 102-110.
- 14) Reiter, M., Bucek, R.A., Stümpflen, A., Dirisamer, A., and Minar, E. Prostanoids in the treatment of intermittent claudication—a meta-analysis. *Vasa* 2002; **31**: 219-224.
- 15) Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., Itakura, H., Kita, T., Kitabatake, A., Nakaya, N., Sakata, T., Shimada, K., and Shirato, K.; Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 2007; **369**: 1090-1098.
- 16) Matsuo, T., Kario, K., Matsuda, S., Yamaguchi, N., and Kakishita, E. Effect of Thrombin Inhibition on Patients with Peripheral Arterial Obstructive Disease: A Multicenter Clinical Trial of Argatroban. *J Thromb Thrombolysis* 1995; **2**: 131-136.
- 17) Morishita, R., Aoki, M., Hashiya, N., Makino, H., Yamasaki, K., Azuma, J., Sawa, Y., Matsuda, H., Kaneda, Y., and Ogihara, T. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 2004; **44**: 203-209.
- 18) Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., Shimada, K., Iwasaka, T., and Imaizumi, T.; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427-435.
- 19) Harada, Y., Yamamoto, Y., Tsujimoto, S., Matsugami, H., Yoshida, A., and Hisatome, I. Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed Res* 2013; **34**: 23-29.
- 20) Shibata, H., Iimuro, M., Uchiya, N., Kawamori, T., Nagaoka, M., Ueyama, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. Preventive effects of Cladosiphon fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2003; **8**: 59-65.
- 21) Hayashi, K., Nakano, T., Hashimoto, M., Kanekiyo, K., and Hayashi, T. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**: 109-116.
- 22) Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.I., Usov, A.I., Ustyuzhanina, N.E., Grachev, A.A., Sanderson, C.J., Kelly, M., Rabinovich, G.A., Iacobelli, S., and Nifantiev, N.E.; Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Bio-Oncologia, Italy. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007; **17**: 541-552.
- 23) Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., and Li, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 2008; **42**: 127-132.
- 24) Matsumoto, S., Nagaoka, M., Hara, T., Kimura-Takagi, I., Mistuyama, K., and Ueyama, S. Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2004; **136**: 432-439.
- 25) Choi, E.M., Kim, A.J., Kim, Y.O., and Hwang, J.K. Immunomodulating activity of

- arabinogalactan and fucoidan in vitro. *J Med Food* 2005; **8**: 446-453.
- 26) Fukahori, S., Yano, H., Akiba, J., Ogasawara, S., Momosaki, S., Sanada, S., Kuratomi, K., Ishizaki, Y., Moriya, F., Yagi, M., and Kojiro, M. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines in vitro. *Mol Med Rep* 2008; **1**: 537-542.
- 27) Wang, Z., Liu, T., Chen, X., You, H., Zhang, Q., Xue, J., Zheng, Y., and Luo, D. Low molecular weight fucoidan ameliorates hindlimb ischemic injury in type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2018; **210**: 434-442.
- 28) Kannel, W.B., and McGee, D.L. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation* 1979; **59**: 8-13.
- 29) Rocha, F.G., Sundback, C.A., Krebs, N.J., Leach, J.K., Mooney, D.J., Ashley, S.W., Vacanti, J.P., and Whang, E.E. The effect of sustained delivery of vascular endothelial growth factor on angiogenesis in tissue-engineered intestine. *Biomaterials* 2008; **29**: 2884-2890.