キトサン- α -リポ酸塩の消化管内機能村田慶史^{1*}, 中村倫子¹, 小藤恭子¹, 磯部隆史¹, 岸 利弘²¹ 北陸大学薬学部² 日本水産株式会社Functions of Chitosan α -Lipoic Acid Salt in the GutYoshifumi Murata^{1*}, Michiko Nakamura¹, Kyouko Kofuji¹, Takashi Isobe¹ and Toshihiro Kishi²¹ Faculty of Pharmaceutical Science, Hokuriku University, Ho-3,
Kanagawa-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1181² Nippon Suisan, Ltd., Otemachi 2-6-2, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8686

We prepared CS-ALA, the α -lipoic acid (ALA) salt of chitosan, and investigated the adsorption of primary or secondary bile acid and the release of ALA *in vitro*. Calcium-induced alginate gel beads (Alg-Ca) containing CS-ALA were also prepared, and the usability of these beads as a vehicle for oral administration was investigated. When CS-ALA was soaked in a taurocholate solution, it released ALA and simultaneously adsorbed bile acid. The adsorbed amount of taurodeoxycholate, a secondary bile acid, was higher than that of taurocholate. These two functions were recognized in Alg-Ca containing CS-ALA irrespective of water content of the gel matrix. As all these elements can be ingested as food, Alg-Ca containing CS-ALA could serve as a useful dietary agent for the prevention of colon cancer.

(Received May 8, 2011 ; Accepted Jun. 25, 2011)

Keywords : chitosan, α -lipoic acid, alginate gel beads, bile acid adsorption**キーワード** : キトサン, α -リポ酸, アルギン酸ゲルビーズ, 胆汁酸吸着

近年, 日本国内においては大腸癌が急激に増加する傾向にあり, その一因として食の欧米化による胆汁酸分泌量の亢進が挙げられる¹⁾²⁾. 日常的な高蛋白・高脂質の食事摂取は, 胆嚢からの一次胆汁酸分泌量, 並びに結腸内において腸内細菌により産生される二次胆汁酸の増加につながる. 二次胆汁酸は粘膜上皮細胞内での活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) の発生を促し, 続いて起こる直接的・間接的な DNA 障害の繰り返し, 癌誘発の引き金となることが報告されている³⁾. それゆえ, 食品成分に含まれる抗酸化物質による ROS や RNS の除去, 食物繊維による胆汁酸の排泄促進, あるいは腸内細菌叢のコントロール等による大腸癌予防の可能性が考えられる.

従来より, 抗酸化物質や天然多糖類をサプリメントとして利用した疾患予防が注目されているが, 例えば, エネルギー産生に関わる補酵素である α -リポ酸 (ALA, チオクト酸) では, 糖尿病, 神経変性疾患, 大腸癌などに対する有効性が報告されてきた^{4)~6)}. また, カニやエビ等, 甲殻類の殻の成分である天然多糖類キチンを脱アセチル化して得

られるキトサン (CS) は, グルコサミンと *N*-アセチルグルコサミンから構成される直鎖型高分子であり, 特定保健用食品として上市されている. CS の経口摂取における生体への影響に関しては多くの研究がなされているが⁷⁾⁸⁾, 著者等も CS がカチオン性多糖類であることに注目した医薬品素材としての有用性について報告してきた⁹⁾. さらに, 褐藻類中に含まれるアルギン酸は α -L-グルロン酸と β -D-マンヌロン酸からなるアニオン性多糖類であり, そのナトリウム塩が消化性潰瘍治療薬として用いられているだけでなく, Ca^{2+} などの多価金属イオン存在下における瞬時のゲル化を利用した薬物等の保持担体としての研究も進んでいる¹⁰⁾¹¹⁾.

本研究では, 抗酸化物質の経口摂取や CS による胆汁酸の吸着・排泄が大腸癌予防のための戦略となりうるという観点から, 弱酸性物質 ALA と CS の塩形成による複合体 CS-ALA の調製を試み, 消化管内での CS-ALA の機能として, その胆汁酸吸着と同時に起こりうる ALA の放出について *in vitro* において検討した. さらに, CS-ALA の消化管移行を考慮し, アルギン酸カルシウムゲルビーズ (Alg-Ca) の CS-ALA の保持担体としての利用について検討を加えた.

¹ 〒920-1181 石川県金沢市金川町ホの3² 〒100-8686 東京都千代田区大手町 2-6-2

* 連絡先 (Corresponding author), y-murata@hokuriku-u.ac.jp

実 験 方 法

1. 試 薬

CS はキトサン粉末 (キトサン F: 分子量 21.3×10^4 Da, 脱アセチル化度 88%, キミカ, 東京) を用いた. また, CS 分子量の影響に関する検討では CS500 (WAKO, 大阪), 並びにキトサン LL, キトサン LL-40, キトサン PSH-80, 高分子キトサン (いずれも焼津水産化学, 焼津) を用いたが, その性状を表 1 に示す. キチンは生化学工業 (東京) より, アルギン酸ナトリウム (1% 水溶液粘度 300 cps), 並びに一次胆汁酸であるタウロコール酸 (TCA) と二次胆汁酸のタウロデオキシコール酸 (TDC) のナトリウム塩はナカラ イテスク (京都) より購入した. ALA 並びにチオクト酸アミド (TA) はシグマアルドリッチ (セントルイス, USA) より購入, 他の試薬についても市販特級品を使用した.

2. CS による ALA の吸着

室温において 20 mg の ALA あるいは, 10 mg の TA を 100 mL のイオン交換水に加えて超音波処理をおこなった後, $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターを通し, ALA 飽和溶液, 並びに TA 飽和溶液を調製した. CS, キチン, アルギン酸 (酸形) の各 10 mg をマイクロチューブに秤量し, ALA あるいは TA の飽和溶液 5 mL を加え, シェーキングインキュベータ (アズワン製 SI-300) にて 25°C で 24 時間並びに 32 時間振とう後に遠心分離 (コクサン製 H-1300: $7700 \times \text{g}$, 室温, 5 分間) し, 溶液中に残存する ALA もしくは TA の量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定, 添加量との差を吸着量として求め, 吸着率 (%) を算出した. HPLC はポンプ (島津製作所製 LC-10AS), パックドカラム (ナカラ イテスク, Cosmosil 5C₁₈-MS-II $150 \times 4.6 \text{ mm}$), インジェクター (レオダイン製, 試料注入量 $20 \mu\text{L}$), 検出器 (島津製作所製 SPD-10AVVP, 検出波長 333 nm) より構成され, 溶離液として 0.1% リン酸: アセトニトリル (6: 4) を用い, 室温にて流量 0.3 mL/min で測定した¹²⁾. 実験はすべて 3 回実施し, その平均と標準偏差を求めた.

3. CS-ALA の調製

イオン交換水 100 mL に 0.8 g の ALA を添加し, マグネチックスターラーでの攪拌, 並びに超音波処理により十分に分散させた後, 1.0 g の CS を加え, さらに 1 時間攪拌した. この懸濁液にエタノール 100 mL を徐々に加えながら攪拌し, 遠心分離 (クボタ製 KN-70: $1710 \times \text{g}$, 室温, 10 分間) により沈殿物を分離した. 沈殿物と共存する ALA を除去するため, 160 mL のエタノールで 3 回, 続いて 40 mL のジエチルエーテルで 1 回洗浄した後, 37°C にて 24 時間乾燥し CS-ALA を粉末として得た.

4. CS-ALA 含有アルギン酸ゲルビーズ (Alg-Ca) の調製

0.1 g の CS を 1.5% アルギン酸ナトリウム溶液 10 g に添加し, マイクロスパーテルにて CS を十分に攪拌して CS

表 1 CS の性状

名称	脱アセチル化度 (%)	分子量 ($\times 10^4$ Da)
CS500	88	51.4
キトサン LL	84	8.3
キトサン LL-40	80	8.2
キトサン PSH-80	86	151
高分子キトサン	89	123

を分散した. この懸濁液 2 g を 80 mg の ALA を溶解した 0.1 M 塩化カルシウム溶液 10 mL に滴下し, 瞬時に形成される Alg-Ca ハイドロゲルビーズを室温にて 24 時間攪拌した. 取り出したハイドロゲルビーズを 37°C にて 24 時間乾燥し, CS-ALA 含有 Alg-Ca をドライゲルビーズとして得た. また, 塩化カルシウムの代わりに, 0.1 M のアスコルビン酸カルシウムあるいはパントテン酸カルシウムの各溶液を用いて CS-ALA 含有 Alg-Ca を調製した. なお, 本法により調製された CS-ALA 含有 Alg-Ca は, 含有する CS の種類によりその径は若干変動したが, いずれもハイドロゲルビーズでは直径約 4 mm, ドライゲルビーズで約 2 mm であった.

5. 粉末 X 線回折

CS-ALA の X 線回折は自動粉末 X 線回折装置 (マックスサイエンス製, MPP3) を用い, 発散スリット 0.05 mm , 発光スリット 0.15 mm , 40 kV, 20 mA の条件下, $5 \sim 100^\circ$ (スキャンスピード $2^\circ/\text{min}$) にて実施した. 得られた結果は, コンピュータプログラム (XPRESS, Bruker AXS) により解析処理した. なお, ALA, CS 並びに ALA と CS の物理的混合物についても, 同様の条件にて X 線回折をおこなった.

6. ALA 放出・胆汁酸吸着試験

あらかじめ 50 mL サンプル管内で 37°C に加温した 2 mM の胆汁酸水溶液 15 mL に, CS-ALA (50 mg) あるいは CS-ALA 含有 Alg-Ca (ハイドロゲル 2 g 相当量, CS 含有量 20 mg) を添加して, 37°C で 1 時間振とうし, ろ過 (コスモナイスフィルター, $0.45 \mu\text{m}$) した後, 吸着した胆汁酸量, 並びに放出された ALA 量を HPLC にて同時定量した. HPLC はポンプ (島津製作所製 LC-10AS), パックドカラム (関東化学, Mightysil RP-18 GP $150 \times 4.6 \text{ mm}$), インジェクター (レオダイン製, 試料注入量 $10 \mu\text{L}$), 検出器 (日本分光製 UVIDEK-100-IV, 検出波長 210 nm) より構成され, 溶離液としてタノール: 30 mM リン酸緩衝液 (pH 3.4): アセトニトリル (6: 3: 1) を用い, 室温にて流量 0.8 mL/min で測定した¹³⁾. なお, あらかじめイオン交換水にて調製した各種胆汁酸, 並びに ALA 標準溶液を用いて検量線を作成した. 実験はすべて 3 回実施し, その平均と標準偏差を求めた.

実験結果および考察

1. 水溶液中における CS への ALA の吸着

CS はポリカチオン性多糖類であり、乳酸や酢酸のような弱酸水溶液中で溶解する。ALA 飽和水溶液中においては CS 自身の溶解はみられなかったが、溶液中の ALA 濃度が減少し、24 時間後には約 45% の ALA が CS に吸着した。CS に比べて低い脱アセチル化度のキチンでは、ALA 吸着率が 15% となり、さらにポリアニオン性多糖類であるアルギン酸では、この現象が全く見られなかった。また、32 時間後においてもほぼ同様の結果となり、これより、CS の ALA 吸着は CS のアミノ基と ALA のカルボキシル基による相互作用に起因すると考えられる。実際、ALA のカルボキシル基がアミド基となっている TA では、CS への吸着は全く認められず (図 1)、これらの結果から、CS は陰イオン交換樹脂と同様に静電的に ALA と結合していると判断した。

2. CS-ALA の粉末 X 線回折

CS-ALA の粉末 X 線回折結果 (5~30 degree) を図 2 に示す。ALA 並びに ALA と CS の物理的混合物は、同じ回折パターンを示した。CS-ALA では ALA のピークは全く

図 1 ALA と TA の CS への吸着
ALA, α -リボ酸; TA, チオクト酸アミド。

図 2 粉末 X 線回折 (5~40° の範囲を表示)
[A] ALA, [B] ALA と CS の混合物, [C] CS-ALA, [D] CS.

観察されず、CS 類似のハロパターンがみられた。これより、本研究で調製された CS-ALA では、ALA は単体の結晶状態ではほとんど存在しないと考えられ、CS と ALA 間の複合体形成が推測された。

3. CS-ALA の胆汁酸吸着と ALA 放出

イオン交換水あるいはエタノール中において、CS-ALA からの ALA の放出は全く認められなかった。一方、2 mM の TCA 溶液中では、TCA の吸着と同時に ALA の放出が観察され、1 時間後には 1 g の CS-ALA あたり $63.9 \pm 6.0 \mu\text{mol}$ ($n=3$) の TCA が吸着し、 $54.2 \pm 0.4 \mu\text{mol}$ ($n=3$) の ALA が放出された (図 3)。二次胆汁酸である TDC 溶液 (2 mM) 中においても、胆汁酸吸着に伴う ALA の放出が観察され、その吸着量は TCA より高値となった。本現象は主として CS 塩のイオン交換反応により起こると考えられるが、これら胆汁酸の臨界ミセル濃度が数 mM であることから¹⁴⁾、CS-ALA が腸管内を移動する時、分泌された胆汁酸を吸着しながら管腔内に ALA を放出する機能を有すると思われる。また、市販されている各種の CS を用いて調製した CS-ALA について、胆汁酸吸着と ALA の放出が認められた (図 4)。胆汁酸吸着量や ALA 放出量は CS 種により変動したが、脱アセチル化度が 80~88% の範囲において、CS の平均分子量とそれらの胆汁酸吸着能との間に明確な関連性はみられなかった。なお、胆汁酸の種類にかかわらず、全ての CS において放出された ALA よりも多く胆汁酸が吸着された。理論的なイオン交換反応が観察されなかった原因については明確ではないが、CS-ALA 表面における胆汁酸の物理的吸着も関与していると推察される。

4. CS-ALA 含有 Alg-Ca の機能

CS-ALA 含有 Alg-Ca は、ハイドロゲルビーズと乾燥ゲルビーズにかかわらず TCA あるいは TDC 溶液中において、それらの胆汁酸を取り込むと同時に ALA を放出した

図 3 CS-ALA による胆汁酸吸着と ALA の放出
■, 胆汁酸吸着量; □, ALA 放出量.

図 4 各種 CS による胆汁酸吸着と ALA の放出
(グラフ横軸は CS 平均分子量 $\times 10^4$ Da を表す.)
■, 胆汁酸吸着量; □, ALA 放出量.

図 5 CS-ALA 含有 Alg-Ca の胆汁酸取り込みと ALA の放出
(グラフ縦軸は 1g のハイドロゲルあたりに換算)
■, 胆汁酸取り込み量; □, ALA 放出量.
[A] ハイドロゲルビーズ, [B] 乾燥ゲルビーズ.

(図 5). この結果は, 保持担体である Alg-Ca が水分を十分に含んだ状態と乾燥状態のいずれにおいても, そのゲルマトリクス内部で CS-ALA の機能が働くことを示している. Alg-Ca を保持担体とした場合, 胆汁酸取り込み量よりも多くの ALA 放出が認められたのは, Alg-Ca 調製時にゲル内部に浸透した ALA が, CS のアミノ基と塩形成するだ

表 2 CS-ALA 含有 Alg-Ca (ハイドロゲル 2g 相当*) の胆汁酸取り込みと ALA の放出

Alg-Ca 調製時のカルシウム塩	TCA (μmol)	ALA (μmol)
アスコルビン酸カルシウム	13.2 ± 0.56 [12.0 ± 0.77]	37.9 ± 1.00 [27.1 ± 0.41]
パントテン酸カルシウム	17.7 ± 0.39 [17.2 ± 0.29]	44.7 ± 1.60 [41.0 ± 0.62]
	TDC (μmol)	ALA (μmol)
アスコルビン酸カルシウム	22.3 ± 0.85 [18.1 ± 0.31]	35.6 ± 1.67 [27.1 ± 1.33]
パントテン酸カルシウム	25.3 ± 0.68 [25.4 ± 1.00]	42.3 ± 0.13 [39.4 ± 1.43]

* 湿潤重量 2g 中に 50mg の多糖類を含有する.

[] 内は乾燥ゲルビーズでの結果を示す.

けでなく, マトリクス間に遊離形として存在するためと考えられる. なお, Alg-Ca ゲルマトリクス内における CS-ALA による胆汁酸の吸着とそれに伴う ALA の解離は, 水溶液中における CS-ALA の場合と比べてより長時間が必要であるものの, 胆汁酸の取り込みに関しては, 1 時間ではほぼ一定となると考えられるが¹³⁾, この点に関してはヒト消化管内の物質移動時間を含めた速度論的な検討が必要とされる. さらに, 経口摂取が可能な水溶性ビタミンのアスコルビン酸カルシウムまたはパントテン酸カルシウムを用いて調製した CS-ALA 含有 Alg-Ca においても, 同様の胆汁酸吸着と ALA 放出が認められた (表 2).

以上の結果から, CS-ALA は生体成分 ALA と消化管吸収されない天然多糖類 CS を原料に簡便な操作によって調製され, 小腸あるいは結腸において一次並びに二次胆汁酸と接触することでそれを吸着し, ALA を放出する機能を有することが見出された. ALA の抗酸化作用と CS の胆汁酸吸着・排泄という 2 つの機能は, いずれも大腸癌の予防につながることを期待される. また, 食品添加物として利用されてきたアルギン酸と, 塩化カルシウムあるいは安全性の高い水溶性ビタミンのカルシウム塩により構成される Alg-Ca は日常的な摂取が可能であり, CS-ALA を含有した Alg-Ca はサプリメントとしての応用を期待しうる. なお, ヒトにおいて経口投与される時には, まず胃内酸性条件下で CS-ALA が CS 塩酸塩に変化しつつ ALA を放出することが予想される. CS 塩酸塩についても胆汁酸吸着能を有するが, 小腸以降で確実に CS-ALA の機能を発揮させるためには, 腸溶性カプセルへの封入等の工夫を施す必要性を考慮すべきと考えている.

要 約

α -リポ酸 (ALA) を用いたキトサンの塩, CS-ALA を調製し, 一次胆汁酸あるいは二次胆汁酸の吸着, 並びに ALA 放出挙動を調べた. また, CA-ALA を含有したアルギン酸

カルシウムゲルビーズ (Alg-Ca) の調製と経口摂取用の担体としての機能についても検討した。一次胆汁酸であるタウロコール酸の溶液中において、CS-ALA は ALA を放出すると同時にその胆汁酸を吸着し、また、二次胆汁酸のタウロデオキシコール酸の場合には、より多くの吸着がみられた。ALA 放出と胆汁酸吸着という 2 つの機能は、CS-ALA を含有した Alg-Ca においても認められ、すべての素材が安全に経口摂取しうることから、それは大腸癌予防のための有用な食品となる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Roynette, C.E., Calder, P.C., Dupertuis, Y.M. and Pichard, C., n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin. Nutr.* **23**, 139-151 (2004).
- 2) Reddy, S., Sanders, T.A.B., Owen, R.W. and Thompson, M.H., Faecal pH, bile acid and sterol concentrations in premenopausal Indian and white vegetarians compared with white omnivores. *Br. J. Nutr.*, **79**, 495-500 (1998).
- 3) Berstein, H., Berstein, C., Payne, C.M., Dvorakova, K. and Garewal, H., Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat. Res.*, **589**, 47-65 (2005).
- 4) Ruhe, R.C. and McDonald, R.B., Use of antioxidant nutrients in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.*, **20**, 363-369 (2001).
- 5) Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L. and Liu, J., Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice : protective effects of R- α -lipoic acid. *J. Neurosci. Res.*, **83**, 1584-1590 (2006).
- 6) Wenzel, U., Nickel, A. and Daniel, H., α -Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂⁻ generation. *Apoptosis*, **10**, 359-368 (2005).
- 7) Yao, H.T., Huang, S.Y. and Chiang, M.T., A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 1525-1534 (2008).
- 8) Baker, W.L., Tercius, A., Anglade, M., White, M.C. and Coleman, C.I., A meta-analysis evaluating the impact of chitosan on serum lipids in hypercholesterolemic patients. *Ann. Nutr. Metab.*, **55**, 368-374 (2009).
- 9) Murata, Y., Kodama, Y., Hirai, D., Kofuji, K. and Kawashima, S., Properties of an oral preparation containing a chitosan salt. *Molecules*, **14**, 755-762 (2009).
- 10) Forster, R.E.J., Thürmer, F., Wallrapp, C., Lloyd, A.W., Macfarlane, W., Phillips, G.J., Boutrand, J.P. and Lewis, A.L., Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. *J. Mater. Sci. : Mater. Med.*, **21**, 2243-2251 (2010).
- 11) Fenyvesi, Z., Auner, A., Schmalz, D., Pásztor, E., Csóka, G., Gyires, K., Marton, S., Klebovich, I. and Antal, I., Preparation of pH-sensitive beads for NSAID using three-component gel systems. *J. Pharm. Sci.*, **98**, 4285-4295 (2009).
- 12) Kofuji, K., Nakamura, M., Isobe, T., Murata, Y. and Kawashima, S., Stabilization of α -lipoic acid by complex formation with chitosan. *Food Chem.*, **109**, 167-171 (2008).
- 13) Murata, Y., Nagaki, K., Kofuji, K. and Kishi, T., Functions of chitosan-ferulic acid salt for prevention of hypertension. *Food Sci. Technol. Res.*, **16**, 437-442 (2010).
- 14) 上野 実, 「生体関連界面活性剤の機能」, フレグランスジャーナル No. 60 (フレグランスジャーナル社, 東京) p. 56 (1983).

(平成 23 年 5 月 8 日受付, 平成 23 年 6 月 25 日受理)