

各分子量キトサンの抗酸化作用

富田久夫、安楽 誠

Antioxidant activity of some different molecular weight chitosans

Hisao Tomida and Makoto Anraku

ABSTRACT

Chitosan, a cationic polysaccharide, is widely employed as dietary supplement and in pharmacological and biomedical applications. Although numerous studies have focused on its applications as pharmaceutical excipients or bioactive reagents, the relationships between molecular weight (MW) and biological properties remains unclear. Therefore, this review describes the possible antioxidant and free radical-scavenging properties of several different MW chitosans in in vivo and in vitro studies. We also describe the relevance of the MW of chitosans and their antioxidant activities.

1. 緒言

最近、ペプチドや高分子多糖類などの高分子材料は、薬物輸送担体として注目されており、標的部位での薬物の最適な放出を可能しているため、副作用の少ない効果的な製剤基材として使用されている。その中でもキトサンはセルロースに次いで2番目に豊富な天然の高分子多糖類であり、天然物由来のため、副作用が少なく、優れた生物学的特性を示す^{1,3)}。通常、キトサンはキチンの脱アセチル化 (Fig. 1) やN-deacetylase (EC3.5.1.41)⁴⁾による加水分解によって生産され、そのマルチな特性のために医療用基材、化粧品、食品添加物、下水デイスポージャーなどの種々の分野において利用されている。また、キトサンは健康食品としても利用され、血清コレステロール低下、脂質消化吸収抑制、血圧上昇抑制、腸内代謝改善作用などを示すことが報告されている⁵⁻¹⁰⁾。

また近年、キトサンのマルチな特性の中でも、その新規効果として抗酸化剤としての役割が注目されている。通常、生体内では、酸素を利用する過程において種々の活性酸素 (Reactive Oxygen Species; ROS) が生成している。しかし、生体はこのROSを消去するきわめて巧みな防御機能を十分に備えているために、生理的条件下では酸素代謝の副産物であるROSやフリーラジカルは、必ずしも怖いものではない。しかし、ROSの過剰な生成や、あってはならな

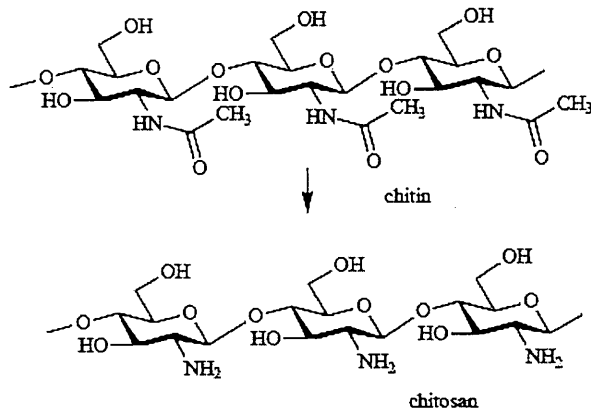


Figure 1. Chitin deacetylation

い場所での生成は、その局所での生成と消去のバランスを崩すことになり、いわゆる酸化ストレス負荷の状態となる。この状態において、多くの病態との関連性が示唆されており、特に腎不全は代表的な酸化ストレス疾患として位置づけられており、腎機能の悪化に、ROSの過剰産生に起因した酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが数多くの報告から明らかにされている^{11,12)}。そのため、これまでの抗酸化治療としてはビタミンCあるいはE製剤を始めとしたROSスカベンジャーの投与により、いかにROSを消去するかという点に関心が集まっていた^{13,14)}。しかし、これらの抗酸化剤では腎不全の進行を抑制するという明確なエビデンスは得られておらず、現在ではむしろROSの発生を抑制するような新しいタイプの抗酸化剤の開発が望まれている。これまでにキトサンにおける抗酸化作用の報告として、その脱アセチル化や分子量の影響が示唆されているものの¹⁵⁻¹⁷⁾、断片的な報告が多く、その詳細について検討した例はほとんど見当たらない。さらにヒトを対象とした抗酸化作用に関する研究においては皆無である。このような背景の下、我々は、キトサンの基本構造単位であるD-グルコサミンから、分子量1,000kDaのキトサンまでの抗酸化作用をin vitro及びin vivo研究において多面的に評価し、抗酸化作用を付与した新たなキトサン利用の可能性について検討した。以下、各分子量キトサンの抗酸化作用とその分子量の関連性に関する研究について最近得られたデータを中心に解説する。

2. In vitroにおける各分子量キトサンの抗酸化作用

キトサンは健康食品の一つとして使用されており、その分子量サイズにより作用が異なる。高分子キトサン（分子量が3万以上）は、消化管内における脂質排泄やコレステロール低下作用などが期待できる。一方、低分子キトサン（分子量が3万以下）は消化管から吸収され体内を循環することから、有害物質の吸着や免疫力の向上などが期待できる。そこで我々は、はじめに吸収後、全身循環系に移行すると考えられる低分子キトサン（CT1; MW: 2.8 kDa）

に着目し、その血管内での抗酸化作用について、血中酸化タンパクのモデルとしてHuman serum albumin (HSA) の酸化の程度を指標とし、キトサンの基本構造であるD-グルコサミン (D-Glc) 及びその誘導体であるN-Acetyl-グルコサミン (NA-Glc) また、抗酸化剤としてアスコルビン酸 (VC) を用いて、酸化ストレスマーカーであるカルボニル及びHydroperoxide 含量の抑制効果について比較検討した。その結果、両反応ともにキトサン誘導体及びVCの添加時間に依存してHSAの酸化は抑制された (Fig. 2A,B)。また、この効果はVC>CT1>D-Glc>>NA-Glcの順で抗酸化作用が観察された。特に、CT1の抗酸化作用はVCには及ばないものの、キトサン誘導体の中で高い抗酸化作用を有することが明らかとなった。また、キトサンの基本構造単位を形成する5員環のC6位にN-アセチル基を含むNA-Glcはほとんど抗酸化作用を示さないことが明らかとなった。次に代表的なラジカル消去試薬である1,1'-diphenyl-

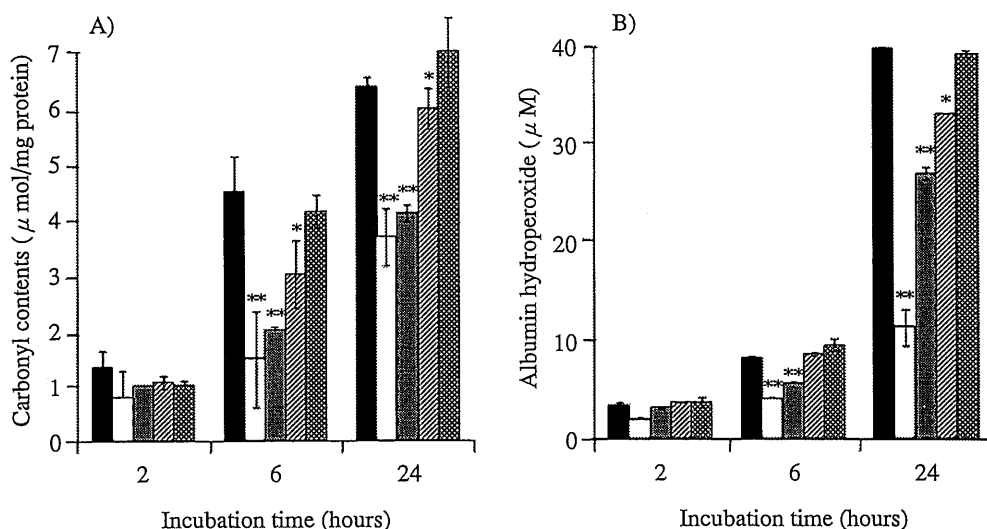


Figure 2. Effect of the presence of chitosan derivatize and VC on carbonyl (A) and HSA-OOH (B) formation after AAPH oxidation on time-dependent manner. The concentration of HSA was 20 mM and AAPH concentration was 40 mM. HSA only (■), VC (0.5 mg/mL) (□), CT1 (5 mg/mL) (▨), D-Glc (5 mg/mL) (▩), and NA-Glc (5 mg/mL) (▧). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with HSA only.

2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いて、そのラジカル消去能を評価した結果、キトサン誘導体及びVCの濃度依存的な抗酸化作用が観察された (Fig. 3)。このとき IC_{50} は VC>CT1>>D-Glc>>NA-Glc (IC_{50} =0.12, 0.87, 1.64, 10<mg/mL) の順で抗酸化作用が観察された。これまでの結果より、NA-Glcは抗酸化作用を示さないことからCT1の構成単位であるC6位に存在するD-GlcNのアミノ基 (-NH₂) が抗酸化能に寄与している可能性が示唆された¹⁸⁾。事実、Pengらはキトサンの基本構造単位である5員環のC2、C3、C6位に存在するアミノ基やヒドロキシル基がフリーラジカルと反応すると報告している¹⁹⁾。また、Fengらは、キトサンが補足する代表的なフ

リーラジカルとして生体内で最も強力なラジカルであるヒドロキシルラジカルを報告しており、その消去率は実に84%にも及ぶと言われている²⁰⁾。また、この結果をChengらもESRスピントラップ法により確認している²¹⁾。しかしながら、これら測定に利用されたキトサンの分子量は、各研究機関において異なることから、次に我々は、脱アセチル化90%以上でキトサン分子量が1,000kDaまでの各分子量サイズのキトサン（今回使用した各分子量キトサンの特性についてTable 1に示す）について、その抗酸化作用を測定し、その分子量との関連性について検討した。

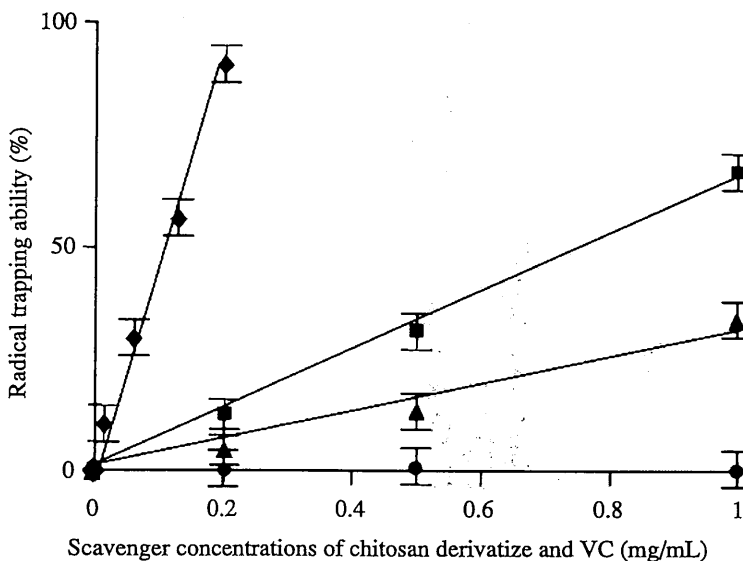


Figure 3. Relative effectiveness of different concentrations of the antioxidants in reducing DPPH radicals. The activities are shown relative to fully reduced DPPH (100%). DPPH radical concentration was measured at 517 nm. The symbols indicate Vit C (◆), CT1 (■), GlcN (▲) and GlcNAc (●).

Table 1 Characterization of seven molecular weight chitosans

Samples ^a	MW (kDa) ^b
CT1	2.8
CT2	17.0
CT3	33.5
CT4	62.6
CT5	87.7
CT6	604
CT7	931

^a All samples and DDA (90 <) were obtained from Wako co. Ltd. and Dainichiseika co. Ltd.(Japan). ^b Calculated from intrinsic viscosity.

はじめに各分子量キトサンの抗酸化作用をDPPHラジカル消去能により評価した結果、低分子のキトサン程、濃度依存的に最も高い抗酸化作用を示し、そのIC₅₀値は、それぞれ、0.87, 3.28, 4.68, 8.15, 9.34mg/mLを示した。一方、分子量1,000kDa以上のCT6,7の高分子キトサンはほとんど抗酸化作用を示さなかった (Fig. 4, Table 2)。また、表には示さないが代表的なラジカル消去試薬であるABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) ラジカルにおいても同様の結果を示した。さらに、これらキトサン分子量の増大と抗酸化作用の大きさの間に良好な相関を観察したことから、キトサン分子量の増大に伴い、抗酸化作用が低下することが明らかとなった (Fig. 5)²²⁾。これら抗酸化作用を示す1つのメカニズムとして、通常、キトサンの基本構造単位である5員環のC2, C3, C6位に存在するアミノ基やヒドロキシル基がラジカルを消去し、抗酸化作用を示すと考えられるが、キトサンの高分子化による構造変化に伴い、これら残基の反応性の低下が示唆される¹⁹⁾。今後、各分子量

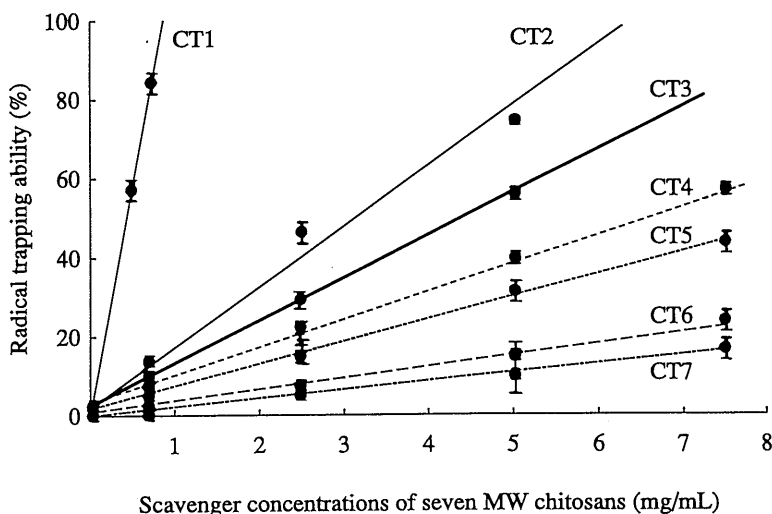


Figure 4. Relative effectiveness of different concentrations of the antioxidants in reducing DPPH radicals. The activities are shown relative to fully reduced DPPH (100%). DPPH radical concentration was measured at 517 nm. CT1 (—), CT2 (—), CT3(—), CT4 (---), CT5(---), CT6 (---), and CT7 (---).

Table 2 Scavenging of DPPH radical

Antioxidant	DPPH
	IC ₅₀ (mg/mL) ^b
CT1	0.87
CT2	3.28
CT3	4.68
CT4	8.15
CT5	9.34
CT6	>10
CT7	>10

^a Relative radical trapping ability was calculated using 0.5mM DPPH.

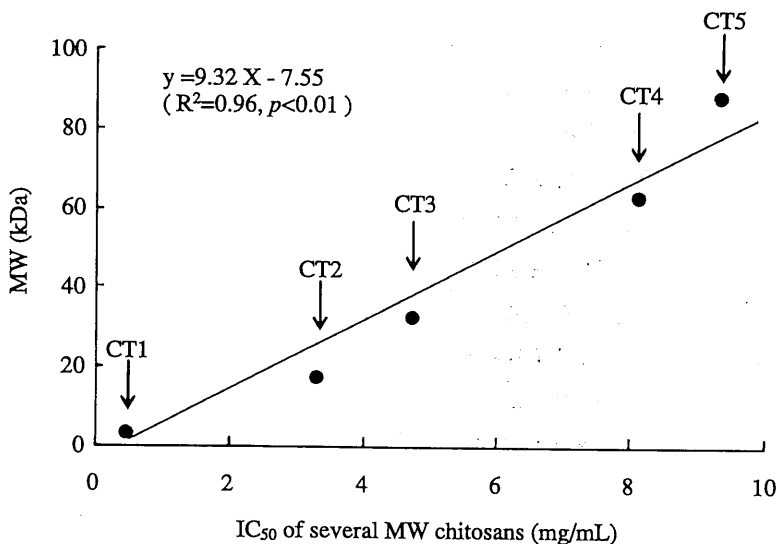


Figure 5. Relationship between MW and antioxidant activity of low MW chitosans. The correlation coefficient (r) between low MW of chitosans and antioxidant activity was significant at the indicated p value.

キトサンにおいて、NMR等の詳細な構造解析により明らかにする必要があるものと考えられる。また、その他のメカニズムとして、キトサンの既存効果であるキレート作用の関連も示唆される。事実、ヒドロキシルラジカルの発生に参与する鉄(II)のキレート作用をPengらは報告していることから、今後、遷移金属のキレート効果についても各分子量キトサンにおける検討が必要であると考えられる¹⁹⁾。そこで、我々は、これら分子量の吸着作用を代表的な薬物であるワルファリン(WF)、腎障害時に蓄積する尿毒症物質であり、生体内酸化促進効果を持つインドキシル硫酸(IS)を用いて、その分子量依存的なキトサンの吸着作用について検討した。その結果、WF、ISともに、キトサン分子量の増大に伴い、その吸着作用は増大した(Fig. 6)。しかし、その吸着作用の増大は、先ほど抗酸化作用で観察された程、顕著な相違は観察されず、最大でも20%程度であった。さらに分子量10kDa以下のCT1では、殆ど吸着作用を示さなかった。これまでに機能性食品としてのキトサンは、消化管からの再吸収を基準として、分子量が3万以上の高分子キトサンと3万以下の低分子キトサンの二つに大別される。一般に高分子のほうが高い吸着能力があり、腸で脂質排泄、コレステロール低下作用などの重要な働きを行うものの体内に吸収しにくく、消化管に限られた作用であるといわれている。一方、低分子キトサンは若干、吸着能力は低下するものの、体内に吸収されやすいため、消化管における作用に加え、全身循環系での同様の作用も期待されている。これまでの結果から、健康食品としての利用を考慮する場合、ある程度の分子量を持つ低分子キトサンの摂取が新規効果である抗酸化作用を付加した効率的な食品と考えられる。しか

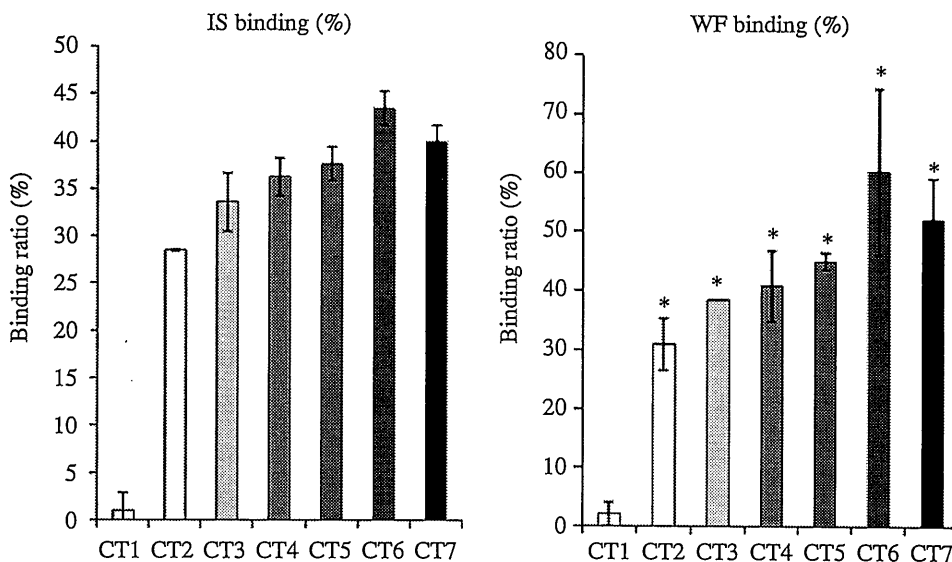


Figure 6. Binding capacity on WF and IS. Results are expressed as the mean \pm SEM.

しながら、これまでに各分子量のキトサン摂取によるヒトにおける抗酸化作用を比較した検討は見当たらないことから、次に我々は、すでに販売されている分子量約200kDaの低分子キトサン (LMC) 及び分子量約1,000kDa (HMC) の高分子キトサンを利用して、健常人10例を対象として、各分子量キトサン服用に伴う血漿中酸化ストレスの変動について、生化学値の変動と併せて調査を行った。

3. *In vivo*における各分子量キトサンの抗酸化作用

LMC及びHMCともに、研究デザインは前向きのオープンラベル試験として、4週間のベースラインの観察後、4週間の各分子量キトサン (LMC; MW: 約200kDa, HMC; MW: 約1,000kDa, 1日服用量として540mg) の服用を、それぞれ健常人10例を対象として行った。全対象例は研究の目的及び計画の説明を口頭及び文書にて受けた後、同意を得られた対象者のみ採血を行った。試験期間中における生化学パラメータの変動を測定した結果、LMC及びHMCともに血圧、総コレステロール及び血糖値は服用後低下傾向を示した。またHDLは有意な上昇を示し、キトサン服用による血液改善効果が観察された (Table 3)。また、図には示していないがLMC及びHMCともにカルシウム及びリン濃度に有意な変動は観察されなかった。次にLMC及びHMCの生体内に及ぼす酸化ストレスの影響について検討した。生体が酸化ストレスに暴露された際、より初期の酸化過程においては、HSAに唯一遊離状態で存在する34位のシステイン残基 (^{34}Cys) の酸化が報告されている²³⁾。還元型HSA (Human Nonmercapt Albumin; HNA) はそのSH基によって様々な物質と結合、運搬、解毒などを行な

Table 3 Effect of chitosan treatment of normal volunteers

	LMC	HMC
	0→4 weeks (% of 0 week)	0→4 weeks (% of 0 week)
SBP(mmHg)	96.4%	96.3%
DBP(mmHg)	99.4%	97.8%
BMI	99.5%	99.2%
TC(mg/dL)	86.3%	81.1%
LDL(mg/dL)	94.2%	92.0%
HDL(mg/dL)	125.2%	118.2%

SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, BMI: body-mass index, TC: total cholesterol, LDL: low-density lipoproteins, HDL: high-density lipoprotein cholesterol.

っていると考えられている。著者らはこれまでに、慢性腎不全患者における酸化ストレスを評価する際のバイオマーカーとして、酸化HSAの妥当性を報告してきた²⁴⁻²⁷⁾。そこで、LMC及びHMC服用に伴う血漿中の酸化ストレスの変動をアルブミン酸化度により経時的に検討した。その結果、LMC及びHMCともに服用4週後にアルブミン酸化度の有意な低下が観察された (Fig. 7)。また、この効果はLMCにおいて、HMCよりも顕著なアルブミン酸化度の

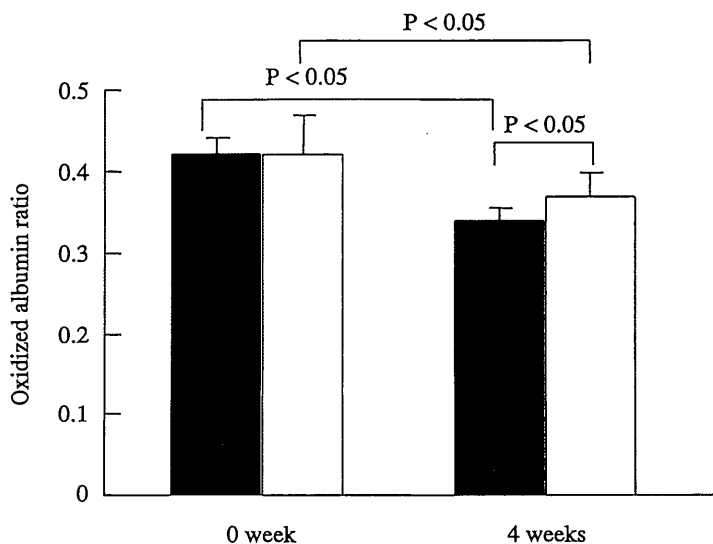


Figure 7. The effects of chitosan treatment on indices of oxidative stress. LMC (■) and HMC (□) was administered at 540 mg to 10 subjects, respectively. Results are expressed as the mean ± SE.

低下を示し、その既存効果である脂質抑制作用は大きな相違は観察されなかったものの、抗酸化作用において顕著な相違が観察された先の*in vitro*の検討結果を支持するものとなった。事実、図には示さないが、LMC及びHMCのDPPHラジカル消去能を評価した結果、先の*in vitro*の検討で算出された各分子量キトサンの結果と同様、LMCにおいては高い抗酸化作用を示したものの、HMCではその効果は殆ど観察されなかった。以上の結果より、LMCは既存の脂質吸着作用に加えた直接的な抗酸化作用を示すものの、HMCは直接ROSを除去するのではなく、消化管内において生体内酸化促進物質としての脂質や尿毒症物質を吸着し、糞中に排泄することにより、間接的な抗酸化作用を示したものと考えられる。以上の知見より、健常者を対象として、LMC及びHMCの血漿中酸化ストレスに及ぼす影響を、前向きオープンラベル試験を行った結果、LMC及びHMCともに酸化ストレスを抑制することを*in vivo*レベルで初めて明らかにした。またその機序は、LMCでは既存の吸着作用に加えたラジカルスカベンジャーとしての直接的なROS除去作用によるものである一方、HMCでは直接的な抗酸化作用ではなく脂質や尿毒症物質のような生体内酸化促進物質の吸着作用による可能性が示唆された^{28,29)}。

4. まとめ

*In vitro*における各分子量キトサンによる抗酸化作用を比較検討した結果、低分子量キトサンほど高い抗酸化作用を示した。またそのメカニズムとしてキトサンの構成単位であるD-GlcNのアミノ基(-NH₂)及びヒドロキシル基が抗酸化作用に寄与している可能性が示唆された。一方、各分子量キトサンの吸着作用は、高分子キトサン程、高い吸着作用を示した。また、*in vivo*研究において、健常者を対象として、各分子量が血漿中酸化ストレスに及ぼす影響を検討した結果、酸化ストレスを抑制することを*in vivo*レベルで初めて明らかにした。特に低分子量キトサンにおいて高い抗酸化作用を示した。またその機序のひとつとして、ラジカルスカベンジャーとしての直接的なROS除去だけでなく酸化促進物質である脂質、尿毒症物質の消化管内での吸着による除去の可能性を見出した。現在、多くの病態の危険因子として酸化ストレスの負荷が注目されている。特に、腎不全患者において、酸化ストレスの負荷は慢性腎不全の進行とも深く関わっていることから、酸化ストレスを抑制することが、腎不全進行の抑制や予防につながると期待されている。しかしながら、抗酸化ビタミン類のように既存のROSスカベンジャーでは十分な治療効果が得られていないため、ROSの発生を抑制するような新しい抗酸化剤の開発が望まれている。本研究では低分子量キトサンが既存の効果において、生体内の脂質や尿毒症物質といった酸化促進物質を減少させ、全身循環系において酸化ストレスを軽減するだけでなく、その直接的な抗酸化作用を持つことを*in vivo*の検討によって、初めて見出した。この多面的な抗酸化作用は他の抗酸化剤である抗酸化ビタミン等より、付加価値が高いことから、これら薬剤の代替あるいはこれら薬物との併用も可能であり、腎不全時をはじめとした酸化ストレス関連疾患に対して新たな抗酸化治療戦略となりうる可

能性を秘めている。また、キトサンは健康食品であることから、これら酸化ストレス関連疾患に対する早期治療あるいは予防のために用いることも出来るかもしれない。これらの知見は、低分子キトサンの高い抗酸化作用を明らかにするだけでなく、今後、健康食品におけるキトサンの利用に際し、抗酸化剤としての位置づけを明確化するとともに、各分子サイズキトサンサプリメントの適正使用を支援していく上での有用な基礎資料になるものと考えられる。

5. 謝辞

本研究に際し、キトサンを提供して頂きました大日本精化工業株式会社並びに日本化薬フロード株式会社にご心より御礼申し上げます。また、本研究に際し、実験にご協力いただきました本学薬学部助手、古谷暢子先生、近藤裕子先生、藤井武修先生、安福平学士をはじめ、福山大学薬学部 製剤物理化学研究室の諸氏にご心から感謝いたします。

6. 引用文献

- 1) Uragami, T., Tokura, S. Ed. *Material science of chitin and chitosan*. New York, Springer (2006).
- 2) Illum, L. :*Pharm Res*, **15**, 1326-31 (1998).
- 3) Dodane, V., Vilivalam, V.D. :*Pharm Sci Technol Today*, **1**, 246-53 (1998).
- 4) Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K. :*Biosci Biotech Biochem*, **60**, 1598-603 (1996).
- 5) Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H., Mitsulka, T. :*Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1439-1444 (1993).
- 6) LeHoux, J.G., Grondin, F. *Endocrinology*, **132**, 1078-1087 (1993).
- 7) Deuchi, K., Kanauchi, O., Imasato, Y., Kobayashi, E. :*Biosci Biotech Biochem*, **58**, 1613-1616 (1994).
- 8) Kato, H., Taguchii, T., Okuda, H., Kondo, M., Takara, M. :*J Traditional Medicine*, **11**, 198-205 (1994).
- 9) Terada, A., Hara, H., Sato, D., Higashi, T., Nakayama, S., Tsuji, K., Sakamoto, K., Ishioka, E., Maezaki, Y., Tsugita, T., Takekawa, T., Mituoka, T. :*Microbial Ecology in Health and disease*, **8**, 15-21 (1995).
- 10) Koide, S.S. :*Nutr Res*, **18**, 1091-101 (1998).
- 11) Mastalerz-Migas, A., Steciwko, A., Pokorski, M., Pirogowicz, I., Drobnik, J., Bunio, A., Muszynska, A., Jasinska, A. :*J Physiol Pharmacol*, **57**, 199-205 (2006).
- 12) Sasaki, S., Yokozawa, T., Cho, E.J., Oowada, S., Kim, M. :*J Pharm Pharmacol*, **58**, 1515-25 (2006).
- 13) Zwolinska, D., Grzeszczak, W., Szczepanska, M., Kilis-Pstrusinska, K., Szprynger, K. :*Nephron Clin Pract*, **103**, 12-8 (2006).

- 14) McCord, J.M. :*Drug Discov Today*, **9**, 781-2 (2004).
- 15) Kim, K.W., Thomas, R.L. : *Food Sci*, **101**, 308-13 (2007).
- 16) Chien, P.J., Sheu, F., Huang, W.T., Su, M.S. : *Food Chem*, **102**, 1192-8 (2007).
- 17) Koryagin, A.S., Erofeeva, E.A., Yakimovich, N.O., Aleksandrova, E.A., Smirnova, L.A., Malkov, A.V. :*Bull Exp Biol Med*, **142**, 461-3 (2006).
- 18) Anraku, M., Kabashima, M., Namura, H., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Furutani, N., Tomida, H. :*Int J Biol Macromol*, **43**,159-64 (2008).
- 19) Peng, C., Wang, Y., Tang, Y. :*J Appl Polym Sci*, **70**, 501-6 (1998).
- 20) Feng, T., Du, Y., Wei, Y., Yao, P. : *Eur Food Res Technol*, **225**, 133-8 (2007).
- 21) Mendis, E., Kim, M.M., Rajapakse, N., Kim, S.K. :*Life Sci*, **80**, 2118-27 (2007).
- 22) Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., Akasaki, K., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Anraku, M. :*Carbohydr Res*, **344**, 1690-6 (2009).
- 23) Anraku, M., Kitamura, K., Shinohara, A., Adachi, M., Suenga, A., Maruyama, T., Miyanaka, K., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Nonoguchi, H., Otagiri, M., Tomita, K. :*Kidney Int*, **66**, 841-8 (2004).
- 24) Anraku, M., Kitamura, K., Shintomo, R., Takeuchi, K., Ikeda, H., Nagano, J., Ko, T., Mera, K., Tomita, K., Otagiri, M. :*Clin Biochem*, **41**, 1168-74 (2008).
- 25) Kadowaki, D., Anraku, M., Tasaki, Y., Kitamura, K., Wakamatsu, S., Tomita, K., Gebicki, J.M., Maruyama, T., Otagiri, M. : *Hypertens Res*, **30**, 395-402 (2007).
- 26) Shimoishi, K., Anraku, M., Kitamura, K., Tasaki, Y., Taguchi, K., Hashimoto, M., Fukunaga, E., Maruyama, T., Otagiri, M. : *Pharm Res*, **24**, 1283-9 (2007).
- 27) Anraku, M., Mera, K., Kitamura, K., Nakajou, K., Maruyama, T., Tomita, K., Otagiri, M. :*Hypertens Res*, **28**, 973-80 (2005).
- 28) Anraku, M., Fujii, T., Furutani, N., Kadowaki, D., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Tomida, H. :*Food Chem Toxicol*, **47**, 104-9 (2009).
- 29) Anraku, M., Fujii, T., Tomida H. et al. :*Carbohydr Poly*. 2009 submit for publication