

博士（人間科学）学位論文

**食物繊維キトサンの長期摂取が引き起こす卵巣
摘出ラットの骨量減少**

**Deleterious Effects of Dietary Fiber Chitosan on
Bone Loss in Ovariectomized Rats Fed a Low Ca
Diet**

2003年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

楊 筑雅

Yang, Chu-Ya

研究指導教員：太田 富貴雄 教授

目次

本研究の概要

本 論

第1章 本研究の背景と意義

第2章 卵巣摘出ラットの骨量と血清コレステロールに対するキトサン長期摂取の影響

緒言

方法

結果

考察

第3章 キトサンの長期摂取が引き起こす卵巣摘出ラットの骨量減少機構

緒言

方法

結果

考察

第4章 キトサンの長期摂取による卵巣摘出ラットの骨量減少に対するビタミン C またはカルシウム添加の効果

緒言

方法

結果

考察

第5章 総合的考察

参考文献

謝辞

履歴

本研究の概要

「ヒトの消化酵素で消化されない食物中の難消化性成分の総体」と定義される食物繊維は、その特異な化学構造と保水性、ゲル化能、吸着能などの物性により、消化管腔内で栄養素やその他の物質と相互作用を行い、結果的に生体内の生理、生化学的機能に影響を及ぼすことが知られている。現在、食物繊維は糖質・タンパク質・脂質・ミネラル・ビタミンにつづく第 6 の栄養素として評価され、また特定保健用食品として広く利用されている。その中で、不溶性食物繊維の一種でカニやエビの殻の主構成成分であるキチンから調製されるキトサンは、アルカリでゲル化する性質を介して消化管からの食事脂肪の吸収を阻害する作用があり、コレステロール低下作用、体脂肪蓄積抑制作用を示すことが報告されている。その一方で、キトサンのキレート作用や吸着作用などにより、カルシウムの腸管吸収を阻害するとの報告もなされている。食事カルシウムの吸収阻害が長期間継続すると、カルシウムの慢性的摂取不足や閉経による骨吸収の亢進時には骨量減少を引き起こす可能性が推測されている。女性では閉経に伴いエストロゲンの分泌が低下する。エストロゲン不足は骨吸収を高めるだけでなく、脂質代謝にも影響を及ぼし、高脂血症や肥満になるリスクも高まる。従って、閉経後女性において、閉経に伴う骨量減少を抑制し、血中コレステロールの上昇を抑え、更には体脂肪の増加を防いで体重を適正に維持することが健康の維持・増進に関する重要な課題となる。

現在、キトサンはダイエット補助食品として広く用いられている。しかし、コレステロール上昇抑制や肥満予防を目的としてキトサンを使用する閉経後女性の骨量にキトサンの長期摂取がどのような影響を与えるかは未だ殆ど検討されていない。そこで、本研究では 1) 長期的なキトサン摂取が卵巣摘出閉経後骨粗鬆症モデルラットの血中コレステロールならびに肥満抑制効果の有効性の確認、骨量に対する影響、2) キトサンの長期摂取が引き起こす骨量低下機構の解明、3) キトサンの長期摂取が引き起こす骨量低下に対するビタミン C

またはカルシウム添加時の予防効果などの検討をそれぞれ試みた。

その結果、キトサンの長期摂取は卵巣摘出ラットにおいて血清総コレステロール低下作用及び腹腔内脂肪の蓄積を有意に抑制する一方、大腿骨骨密度、骨強度を減少させ、骨粗鬆症の進行を助長する可能性を新たに見出した。また、本研究では、先行研究と違ってコレステロール無添加飼料を使用したことから、キトサン摂取群で観察された血清コレステロール上昇抑制は内因性コレステロールの腸肝循環が一部阻害されることによる可能性が大きいと、その作用機構の詳細についてはさらなる研究が必要である。

次に、キトサンの長期摂取が引き起こす骨量低下機構を骨代謝マーカー、カルシウム調節ホルモン、カルシウムならびにリンの出納、十二指腸に存在するカルシウム吸収に関連する vitamin D receptor (VDR), vitamin D dependent calcium binding protein (CaBP D9K) mRNA の発現、カルシウムの腸内吸収に強く関与する盲腸内有機酸などの量的変動から検討した。その結果、カルシウムの腸管吸収についてキトサン摂取群と対照群の差が見られなかったのに対し、キトサン摂取はリンの腸管吸収を有意に減少させた。また、骨量が減少したキトサン摂取群では、尿中カルシウム排泄の増加と血中カルシウム値の低下が見られ、PTH 及び $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が有意に増加した。それに伴って、キトサン群の十二指腸 CaBP D9K と VDR mRNA レベルも有意に増加した。そして、キトサン摂取群では骨吸収すなわち骨からのカルシウム流出の割合を反映するデオキシピリジノリンの尿中排泄量が増加する傾向が見られた。これらの結果から、キトサンの長期摂取による骨量減少はカルシウムの吸収が阻害されるというより、尿中へのカルシウム排泄が促進され、低カルシウム血症を伴う骨吸収の亢進に基づくことが示唆された。また、キトサンによるカルシウムの尿中排泄増加はリンの吸収阻害作用を介して発現する可能性も示された。一方、キトサン摂取群の盲腸内有機酸が増加したにもかかわらず、盲腸内 pH が低下しなかったことから、カルシウムの盲腸からの吸収が促進される可能性は少ないことが示された。それに対して、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の上昇を介して、カルシウムの能動輸送に関与する VDR 及び CaBP D9K mRNA

が増加した結果、キトサン摂取がビタミン D の吸収阻害ないしは腸管上皮組織の損傷を介してカルシウムの腸管吸収に影響を及ぼす可能性のないことが示された。

最後に、キトサン摂取による骨量減少がビタミン C 及びカルシウムの添加により軽減できるか否かについて検討したところ、ビタミン C は尿中へのカルシウム排泄を抑制することによってキトサン摂取が引き起こす骨量減少を軽減し、カルシウム補充はカルシウムの体内保留量を増やし、キトサン摂取による低カルシウム血症を改善することによって、骨吸収を抑制し骨量を維持することが示された。

現在、キトサンは肥満、高脂血症などの生活習慣病に対する予防効果が期待される機能性食品因子である。我々の結果から、閉経後女性や高齢者がキトサンを摂取する際には、カルシウムやビタミン C の摂取を増加するなどして骨量減少を招かないように十分注意する必要があることが示された。

第 1 章 本研究の背景と意義

食物繊維はヒトの消化酵素で消化されないので、かつては栄養的に役立たないものとして取り扱われてきた。しかし、現在、先進諸国に増加している肥満、糖尿病、動脈硬化、大腸ガンなどがアフリカ原住民にほとんどみられないことから、彼らが先進国の人々より多く摂取している食事の未消化成分が注目されるようになった。近年、食物繊維は炭水化物・タンパク質・脂質・ビタミン・ミネラルにつづく第 6 の栄養素として評価されるようになった。食物繊維の定義については、国際的には意見の統一がまだ得られていないが、日本では 1980 年桐山の提案で「ヒトの消化酵素で消化されない食物中の難消化性成分の総体」として受け入れられている。

食物繊維は水に対する溶解性や生理作用の違いから、グアーガム、グルコマンナン、ペクチン、海藻多糖類などの水溶性食物繊維(water soluble dietary fiber, SDF)とセルロース、リグニン、キチン、キトサンなどの不溶性食物繊維(water insoluble dietary fiber, IDF)に大別される。これらの食物繊維は消化管内で種々の物理化学的性質を発揮すると考えられるが、このうち栄養生理学的にみて重要な特性として、以下のようなものがあげられる。水分を吸って膨潤する。消化管内で食物成分の拡散を阻害する。ミネラル、胆汁酸、有害物質などを吸着する。大腸内の細菌によって分解され、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸を産生する。消化管へ機械的刺激を与える。摂食された食物繊維はこれらの作用より消化管腔内で栄養素やその他の物質と相互作用を行い、結果的に生体内の生理、生化学的機能に好ましい影響を及ぼす。そして現在、食物繊維は後述の三次機能(生体調節機能)を有することが明らかにされ、機能性食品としての役割を果たすことが期待されている。食品には生命を維持する栄養機能とおいしさなどを感じさせる感覚機能、すなわち第 1 及び第 2 の機能と呼ばれる属性から専ら評価されてきた。しかし、最近ではアレルギー発症の低減化や免疫能力を高めるなどの生体防御作用、高血圧、糖尿病、腫瘍、先天性代謝異常などを予防し回復する作用、神経活動や消化作用を調節する作用、過酸化脂質生成を抑制して老化を防御する作用など、より高次の生体活動に対する調節機能が注目され

るようになった。この体調調節機能を有する成分を含む食品、つまり機能性食品は、日本の厚生労働省から「特定保健用食品」と認定されると、体脂肪の増加を抑制する、あるいは血清コレステロールや血糖値を正常に保つことを助けるなどの効果を表示することが公に認められている。不溶性食物繊維の一種でカニやエビの殻の主成分であるキチンから調製されるキトサンは、アルカリでゲル化する性質を介して消化管からの食事脂肪の吸収を阻害する作用があり、肥満防止や血清コレステロール上昇抑制に有効な食品素材として注目を集め、特定保健用食品の素材として実際にビスケット、即席粥、即席麺などいろいろな食品に添加されて、広く利用されている。

キチンは、N - アセチル - D - グルコサミン残基が β -1, 4 結合した多糖類であり、カニ、エビの甲殻中に 10 ~ 30% 含まれて、生物体の骨格形成や外界からの生物固体を保護する役割をしている。キチンは分子構造が非常に強固な結晶構造しているため、水、有機溶媒や希酸、希アルカリ液に不溶で、そのままでは用途が少なくあまり利用されていない。しかし、キチンを濃アルカリ溶液とともに加熱すると、N-脱アセチル化してキトサンが得られる。キトサンは高温、強アルカリにも安定な塩基性多糖類で、水には不溶であるが、塩基、酢酸、クエン酸（硫酸、リン酸は不溶）などの酸が存在すると塩をつくって溶け、粘稠カチオン性コロイドとなる。天然物由来の唯一のカチオン性高分子であり（武田 1995）摂取されると胃の酸性下で溶け、そのあと消化管腔内を移動しながら他の食品成分と相互作用を繰り返しながらイオン交換能、吸着能、ゲル化能を発揮して、それらの消化、吸収過程を修飾し、更には生体の生理、生化学的状态や機能にも影響を与えられ考えられる。キトサンは血清コレステロール低下作用(Sugano 1980, Jennings 1988, Maezaki 1993, LeHoux 1993, Omori 1999)、脂質消化吸収抑制作用(Deuchi 1994)、血圧上昇抑制作用(Kato 1994, 吾郷 1996)と腸内代謝改善作用(Terada 1995)を示すことが報告されている。

その一方で、キトサンの食物繊維としての特性から、カルシウムの体内吸収を阻害するとの報告もなされている(Gordon 1983)。キトサン摂取による食事カルシウムの吸収阻害が長

期間継続すると、カルシウムの慢性的摂取不足や閉経による骨吸収の増加時には骨量減少を引き起こす可能性が推測されている。特に、女性では閉経に伴い、エストロゲンの分泌が低下して骨吸収の亢進が起こり、骨形成とのバランスが崩れて骨量減少を来し、骨粗鬆症となる危険性が増す(Riggs 1991, Colin 1999)。エストロゲンは更に脂質代謝にも関与し、閉経後女性では冠状心血管疾病、高脂血症や肥満になるリスクが高まる(Matthews 1989, Gordon 1978)。したがって、閉経後女性において、閉経に伴う骨量減少を抑制し、血清コレステロールの上昇を抑え、更には体脂肪の増加を防いで体重を適正に維持することが健康の維持・増進に関する重要な課題となる。

現在、キトサンはダイエット補助食品として広く宣伝されている。しかし、コレステロール上昇抑制や肥満予防を目的としてキトサンを使用する閉経後女性の骨量にキトサンの長期摂取がどのような影響を与えるかはまだ不明である。本論文は、閉経後状態において、長期的なキトサン摂取が血清コレステロールならびに肥満抑制効果の有効性、骨に対する影響の解明、またその機構解明及び予防法などを調べることを目的とした。なお、本研究における動物実験は、動物実験委員会の承認を得て「早稲田大学人間科学部動物実験に関する指針」に沿って行われた。

第2章 卵巣摘出ラットの骨量と血清コレステロールに対するキトサン長期摂取の影響

緒言

キトサンは、カニ、エビ等の甲殻類の殻を原料とし、それらを脱タンパク質、脱アセチル化処理して製造され、高温、強アルカリにも安定な塩基性多糖類であり、酸の存在下で溶けて粘稠なコロイドとなるカチオン性高分子である。その特異的な物性から、キトサンは胃内の酸性条件下では溶解して強い粘性を生じ、小腸管腔内では脂肪を吸着して、その消化吸收を阻害し糞便中への排泄を増加させる(Deuchi 1994)。また、陰イオンを持つ胆汁酸とのイオン結合を介して、胆汁酸ミセルの形成を抑え、コレステロールの腸管循環を妨げることにより血清コレステロールを低下させる(Maezaki 1993)。キトサンは毒性が非常に低いと報告され(Furda 1983)、血清コレステロールを低下させ、また体脂肪の増加を抑制する健康補助食品として広く使用されている。しかしながら、これらの有益な効果と逆に、キレート作用や吸着作用などの特性から *in vivo* 及び *in vitro* においてキトサンはカルシウムの腸管吸収を阻害するとの報告も出されている(Gordon 1983, 桑野 1987, Deuchi 1995)。カルシウムは生体内のあらゆる組織、体液中に存在し、その 99%は骨に存在するという。骨は、骨吸収と骨形成すなわち骨改造(リモデリング)が常に営まれている。骨の古くなった微細構造部分は破骨細胞によって分解され(骨吸収)、その後骨芽細胞による修復(骨形成)が繰り返されている。正常な骨ではこの骨吸収と骨形成が等しく保たれている(木村 1994)。食事性カルシウムの腸管吸収がキトサンにより長期間継続して阻害されると、血清中のカルシウムレベルが低下して副甲状腺機能が亢進し、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌が高まる。この PTH は破骨細胞を増加させて骨吸収を促進し、血液中のカルシウムレベルを維持する(木村 1994)。骨吸収が骨形成よりも促進されるアンカップリング状態が長く続くと、骨量減少を起こす。一方、女性では閉経に伴って骨吸収を抑制する働きをもつ女性ホルモンが著しく減少し、骨吸収が亢進して骨量の低下が必然的に起こる。その上、カルシウム吸収が阻害される場合、骨減少が一層加速され骨粗鬆症を発症する危険が増大することが想

定される。一方、人の血清脂質も性ホルモンの影響を強く受けている。閉経後、エストロゲン濃度の急激な低下によって血清総コレステロール濃度が上昇する(Walsh 1991)。血清総コレステロールが高いと、アテローム性動脈硬化症や虚血性心疾患の発症率を高めることが多くの疫学的研究の結果から明らかにされている(葛谷 1978)。

現在、キトサンは中高年女性の間で、肥満を予防するダイエット補助食品として広く用いられているが、その安全性を追求するために、キトサンによるカルシウムの腸管吸収阻害が骨量減少を引き起こすかどうかを調べる必要がある。しかし、キトサンを長期摂取した場合の骨量に対する影響について検討した報告は数少なく(桑野 1987, Deuchi 1995)、骨量が急速に低下する閉経後に対するキトサン摂取の影響についての検討例はほとんどない。また、これまで食物繊維やキトサンの血清コレステロールに対する影響について検討された多くの研究は、飼料に 0.5~1.0%程度のコレステロールと 0.25%の胆汁酸を添加し、血清コレステロールを上昇しやすくした基本飼料に各種の食物繊維を加えて血清コレステロール濃度の上昇抑制能を比較するものであった。このような条件下での食物繊維の効果は、食物繊維のコレステロール代謝に与える影響の一面を見ているにすぎない。そこで、本実験は物性が異なるキトサン、グルコマンナン、セルロースの3種の食物繊維を含むコレステロール無添加飼料を閉経後女性のモデルである卵巣摘出 SHRSP ラットに 45 日間投与して、これらの食物繊維が血清コレステロール及び骨にどのような影響を与えるかについて検討した。

方法

1. 実験動物及び飼育方法

実験動物として、6週齢雌 SHRSP ラット(Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat, 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット)28匹を、(株)日本生物材料センターから購入して使用した。実験ラットは市販固形飼料(MF, オリエンタル酵母(株))で13週齢まで飼育後、卵巣摘出手術(OVX)を施し、ステンレス製6連ケージにて飼育した。卵巣摘出手術は以下の方法で行った。まずラットにジエチルエーテルを吸引させて麻酔し、後背部腰椎周辺部を剃毛、70%エタノールで消毒した。皮膚を一カ所切開し、内部の両腎臓周辺の筋肉を左右二カ所小さく切開し、それぞれ卵巣を脂肪ごと引き出した後、子宮との接合部で切断して取り出し、子宮は内部に戻した。皮膚の切開部は手術用クリップで留め、70%のエタノールで再度消毒した。動物は恒温恒湿(室温 24 ± 2 、湿度 $50 \pm 5\%$)に保たれた飼育室にて飼育し、照明条件は7:00点灯、21:00消灯とした。各群の平均体重が等しくなるよう食物繊維無添加群(FF)、セルロース投与群(CE)、キトサン投与群(CH)、グルコマンナン投与群(GL)の4群に分け、飼料及び飲料水(蒸留水)を45日間自由摂取させた。各ラットの体重は週1回測定し、飼料摂取量は1日おきに測定した。

2. 飼料組成

実験飼料の組成を Table 1-1 に示す。食物繊維無添加飼料の基本組成はアメリカ栄養学会の策定した成熟ラット用の AIN-93M に準拠したが(Reeves 1993)、カルシウムの配合比 0.5% を 0.1% に下げ、低カルシウム飼料とした。食物繊維添加飼料は無添加飼料の生コーンスターチの一部をセルロース、キトサンまたはグルコマンナンで置換し、飼料中の含量がそれぞれ 10% になるように調整した。キトサン(Katakura - Chikkarin Co.,製)は脱アセチル化度 75 ~ 90%、粘度 300 ~ 800cps(平均分子量の指標でキトサン 0.5%、溶媒 0.5%酢酸溶液、20 で

の回転粘度)、粒度は 16 メッシュ以下であった。カルシウム欠乏ミネラル混合 93MX とビタミン混合およびセルロースは日本農産工業(株)製であった。生コーンスターチ、 α -コーンスターチ、大豆油はそれぞれサンエイ糖化(株)製、日本食品化工(株)製と味の素(株)製のものを用いた。炭酸カルシウム(CaCO_3)は和光純薬(株)製のものを使用した。

3. 試料採取と処理

飼育終了後、一夜絶食させたラットにペントバルビタールナトリウムを体重 100 g あたり 0.5mg の腹腔内注射により麻酔したあと心臓より採血した。血液は遠心分離(3000rpm、10 分、5℃)して血清を得、コレステロールとミネラル濃度の測定に当てた。その後直ちに肝臓、子宮、脂肪組織(後腹壁ならびに腎周辺)を摘出して湿重量を測定した。屠体からは骨試料として左右両脚から大腿骨を摘出し、軟組織を除去後、長さ、重量を測定した。大腿骨試料は骨密度及び骨強度測定まで生理食塩水に入れ、-30℃で保存した。

4. 分析方法

血清中の総コレステロールは酵素法による市販の臨床用キット(コレステロール C-テストワコー,和光純薬(株))を用いて測定した。血清 HDL-コレステロールの定量にはヘパリン・マンガン結合沈殿法に基づく HDL-コレステロールテストワコー(和光純薬(株))を用いた。血清無機リンは Taussky 法に基づき、硫酸第一鉄アンモニウムを還元剤を用いたピーテストワコー(和光純薬(株))にて測定した。血清中のカルシウム、マグネシウム、鉄は原子吸光法で定量した。

骨密度は、2重エネルギーX線骨塩分析法(DPXL, Lunar, US)により測定した。骨強度(stiffness)はオートグラフ AGS-100D(島津製作所)を使用してプランジャースピード分速 5mm、サンプルホルダー間隔 12mm 条件で3点曲げ試験法(three point-bending methods)により計測した。大腿骨は部位によって骨強度が異なるため、常に同じ部位の強度を求める必

要がある。そこで、測定時に、まず大腿骨長をノギスを用いて計測後中央に印を付け、その印が骨強度試験機のプランジャーのすぐ下に来るように試料を設置した(Fig. 1-1)。骨強度はプランジャーが大腿骨に達してから破断するまでにかかった力であり、この値が大きいほど骨が硬いことを示す。骨強度を測定したのち、骨灰化を行った。まず、湿重量(fresh bone weight)を測定してからるつぼに入れて 100 の乾燥器中で 24 時間乾燥させた。その後、乾燥重量(dry bone weight)を測定し、各骨をそれぞれ同じるつぼに戻した。再びるつぼごと重量を量り、電気炉(muffle, Yamato Scientific Co., LTD Japan)で、1 時間 100 の割合で徐々に温度を上昇させながら 600 で 24 時間灰化した。デシケーター中で室温にまで冷却したるつぼは骨灰ごと重量を測定した。大腿骨水分量、有機成分量および灰分量を以下の式により算出した。

$$\text{水分量}(\%) = \{(\text{湿重量} - \text{乾燥骨重量}) \div \text{湿重量}\} \times 100$$

$$\text{有機成分量}(\%) = \{(\text{乾燥骨入りるつぼ重量} - \text{灰化骨を含むるつぼ重量}) \div \text{湿重量}\} \times 100$$

さらに、乾燥骨を入れたるつぼ重量と乾燥骨重量の差からるつぼ重量を求め、灰化骨を含むるつぼ重量との差から灰化骨重量を求めた。

$$\text{灰分量}(\%) = \text{灰化骨重量} \div \text{湿重量} \times 100$$

5. 統計的処理

測定値は、平均値 ± 標準誤差で示した。全ての統計処理は、分散分析を行い、平均値の差の検定は Tukey 型の多重比較法を用いて有意水準 5% 未満($P < 0.05$)で検定した。

結果

1. 体重増加量、飼料摂取量

実験期間終了時までの増体重(body weight gain)は、FF 群に比べ食物繊維添加群である CE 群、CH 群と GL 群がそれぞれ約 22%、31%、48%有意に低下した($P<0.05$, $P<0.01$, Table 1-2)。GL 群の飼料摂取量はほかの 3 群に比し有意な低値を示した($P<0.01$)。CH 群の飼料摂取量は FF 群と CE 群に比べて増加する傾向は見られたが有意差は認められなかった。飼料摂取量に対する体重増加の割合である飼料効率は CH 群と GL 群が FF 群に対して有意な低値を示した ($P<0.01$)。

2. 臓器重量

肝臓及び子宮の重量は各群間に差が認められなかった(Table 1-3)。水溶性食物繊維である GL 群では盲腸組織及び内容物重量がほかの 3 群に比し有意な肥大が見られた($P<0.01$)。それに対して、不溶性食物繊維の CE 群と CH 群では、大腸の有意な増大が観察された(CE: $P<0.01$ vs FF, $P<0.05$ vs GL, CH: $P<0.01$ vs FF and GL)。体脂肪の指標である腹腔内脂肪重量では、CH 群の飼料摂取量が最も多かったにもかかわらず、FF 群に比べ 37%の有意な低値を示し($P<0.01$, Fig. 1-2)、CE 群に比べても 23%の減少が認められ($P<0.05$, Fig 1-2)、キトサンの体脂肪蓄積抑制作用が裏付けられた。飼料摂取量が有意に少なかった GL 群では、腹腔内脂肪重量が FF 群と CE 群に比べて有意に減少した($P<0.01$, Fig 1-2)。

3. 血清総及び HDL - コレステロール濃度

血清総コレステロール濃度(ml/dL, Table 1-4)は CH 群(92.3 ± 2.0)が FF 群(114.7 ± 3.7)及び CE 群(107.7 ± 3.7)に比べて有意に低値であった($P<0.01$ vs FF, $P<0.05$ vs CE, Fig 1-3)。GL 群の血清総コレステロール濃度も FF 群より有意に低かった($P<0.05$, Fig. 1-3)。HDL-コレステロール

についても、CH 群も有意な低値を示した($P<0.01$ vs FF, $P<0.05$ vs CE, Fig. 1-3)。すなわち、コレステロール無添加飼料で飼育した卵巣摘出ラットにおいてもキトサンの血清コレステロール上昇抑制効果が確認された。

4. 血清ミネラル濃度

血清カルシウム及び無機リン、血清鉄濃度は各群間に有意差が認められなかった(Table 1-5)。血清マグネシウムについて、CH 群が CE 群に比べ、有意な低値を示した($P<0.05$)。

5. 大腿骨分析値

大腿骨分析値を Table 1-6 に示す。大腿骨湿重量(fresh bone weight)は体重増加量と同様な傾向が見られ、FF 群で最も大で、次いで CE 群であった。しかし、CH 群は体重増加量が GL 群より多かったにもかかわらず骨湿重量が GL 群に比べて小さく、FF 群に対しては有意に低い値を示した($P<0.05$)。成長抑制が著しく見られた GL 群の骨長は FF 群に比し有意な低値を示した($P<0.01$)。CH 群(0.164 ± 0.002)の骨密度(BMD, g/cm^2)は FF 群(0.184 ± 0.003)、CE 群(0.183 ± 0.002)と GL 群(0.176 ± 0.003)に比べ、有意な低値を示した($P<0.01$ vs FF and CE, $P<0.05$ vs GL, Fig. 1-4)。大腿骨強度(kgf)も CH 群(11.88 ± 0.20)で、FF 群(13.59 ± 0.33)と CE 群(13.36 ± 0.26)に比べ有意な低下が認められた($P<0.01$, Fig. 1-4)。GL 群の骨強度も FF 群と CE 群に比べ有意に低かった($P<0.01$, Fig. 1-4)。CH 群の骨灰分量(bone ash (%), 33.2 ± 1.0)は FF 群(36.7 ± 0.3)、CE 群(35.9 ± 0.4)と GL 群(35.8 ± 0.3)に比べ、有意に低値であり($P<0.01$)、キトサンの投与による骨量の低下が見られた。

考察

本研究では、閉経後女性のモデルとして卵巣摘出(OVX)ラットを作成し、コレステロール無添加飼料投与下でキトサン長期摂取による血中コレステロール低下作用及び骨量減少に及ぼす影響について種々の食物繊維と比較検討した。

本研究では、13週齢の卵巣摘出 SHRSP ラットを閉経後女性モデルとして使用した。通常のラットでは生理的老化に伴う骨量の減少は僅かで、人間において見られるような明白な老人性骨粗鬆症は自然には起きない。SHRSP ラットでは、2~3か月齢まで骨の成長は通常ラットと有意な差を示さないが、3ヶ月齢以降から骨粗鬆症化は始まり、加齢に伴って症状も進行することが示されている(Yamori 1991)。すなわち、SHRSP ラットは加齢とともに骨粗鬆症を自然発症するので、卵巣摘出により作成される閉経後骨粗鬆症は、人の場合と同様にその根底に老化があることから閉経後女性の生理特性に最も類似すると考え、本実験では卵巣摘出を施した SHRSP ラットを閉経後骨粗鬆症のモデルとして使用した。

血清コレステロール量の変化は主として LDL-コレステロール量の変動を反映しており、その LDL の濃度は主として肝臓から VLDL として分泌され LDL へ代謝される量と肝臓の LDL 受容体により除去される量によって決まる(Ebihara 1994)。LDL 受容体活性の変動は血清コレステロール濃度の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。女性ホルモンのエストロゲンは肝臓の LDL 受容体活性を増加させ、血清 LDL-コレステロールの肝臓内への取り込みを増加させることにより血清コレステロール濃度を低下させるとされている(Mabuchi 1985)。従って、閉経後、エストロゲン作用の低下に伴い女性の血清コレステロール濃度は上昇する。海老原らは偽手術対照群に比べ卵巣摘出群のラットの血清コレステロール濃度が上昇傾向を示したことを報告した(Ebihara 1994)。本実験で、不溶性食物繊維である CH 投与群及び水溶性食物繊維である GL 投与群で血清総コレステロール値が有意に低下し、卵巣摘出ラットにおいてもキトサンとグルコマンナンの血清総コレステロール低下

作用が確認された。特に、キトサンの効果が顕著で、FF 群に比べて約 20%もの低下を引き起こした。

キトサンは高コレステロール負荷ラットに対して、強い血中コレステロール低下作用を示すことがよく知られている(Sugano 1980, Jennings 1988, Maezaki 1993, LeHoux 1993, Omori 1999)。キトサンは糖鎖中にアミノ基を有するため、酸性領域の胃内で溶解され膨潤して粘性を生じ、周囲の食物成分を抱き込むとともに、穏やかなイオン交換を介して陰イオン物質を糞便として体外に排出する。小腸上部ではキトサンは胆汁酸を吸着して糞便中への排泄を増加させる。胆汁成分として小腸に分泌される胆汁酸はミセルとして脂溶性物質の腸管吸収に係わったあと再吸収されて肝臓に運ばれ(腸肝循環)、再び胆汁成分として利用される。キトサンにより胆汁酸の再吸収が減少すると肝臓におけるコレステロールからの胆汁酸合成を高めて胆汁の補充を行う。肝臓のコレステロール濃度が低下すると血清コレステロールを取り込んで肝臓のコレステロール量を維持するようになり、結果的に血清コレステロール濃度が低下すると考えられている(Maezaki 1993)。本実験の飼料中にはコレステロールも胆汁酸も添加していないので、キトサン群における血清総コレステロール濃度の低下は内因性コレステロール代謝の変動を介して発現されたものと考えられる。その作用機構としては胆汁酸の排泄増加や胆汁酸合成の促進(Sugano 1980)、短鎖脂肪酸(SCFA)の脂質代謝への影響(早川 1999)などが考えられる。しかし、Fukada ら(1991)はキトサンを摂取したラットの糞中胆汁酸排泄量が増加しなかったことを報告し、Ebihara ら(1993)はコレステロール無添加飼料を与えられたラットの盲腸内に食物繊維の腸内発酵産物で短鎖脂肪酸(SCFA)の一種であるプロピオン酸を注入することにより血清コレステロール濃度が低下することを報告した。また、Chen ら(1984)はプロピオン酸が肝臓でのコレステロール合成の阻害を介して血清コレステロール濃度の低下をもたらす可能性を示唆している。食物繊維であるキトサンも大腸で腸内細菌の作用を受け SCFA を生じる。しかし、SCFA が血清コレステロール濃度に影響を与えないとの報告もある(Illman 1991)。本実験では、コレステロー

ル無添加飼料を用いているので、キトサン群では内因性コレステロールの生成が抑制された可能性が大きいですが、その作用機構について、今後さらに検討する必要がある。

本研究では、食物繊維添加群の CE 群、CH 群と GL 群には明らかな発育抑制が認められた。この体重の差異は、飼料中のデンプンが食物繊維であるキトサンやセルロースで置換されているため、エネルギー摂取量が低下したことに起因するものと思われる。また、食物繊維投与により腸管粘膜が機械的損傷を受け剥離脱落したため、そこに存在していた消化酵素が減少し(Oku 1982)、栄養分の消化吸収能が低下した可能性も考えられる。水溶性食物繊維の GL 群の飼料摂取量はほかの食物繊維添加群に比べ、有意に低かった(Table 1-2)。これは水溶性のグルコマンナンが腸管内で水を吸収し大きく膨潤して容積を増やし満腹感が生じやすいことによると推測される(武田 1995)。飼料摂取量が少ないと、体重増加量が小さくなるのは当然のことであるが、CH 群の飼料摂取量は各群間において最も多かったにも関わらず、体重増加量が FF 群と CE 群より少なくなった。さらに、CH 群の腹腔内脂肪重量も FF 群と CE 群よりそれぞれ約 37%、23%の減少が認められた。この減少はキトサンによる脂質の消化吸収が抑制された結果と考えられる。キトサンは胃内で溶解し、食事中脂肪と混じり合い脂肪を小さな油滴状にする。それが腸に移行して弱アルカリ条件になると、油滴を包み込みゲル化する。そうになると消化酵素は作用できず、そのまま排泄されることが示されており(Kanauchi 1995)、本研究でのキトサン群の体重と脂肪組織量の増加抑制はキトサンの食事脂肪に対する吸着作用によって脂質の腸管吸収が一部阻害されたことによると推察される。

ラットに食物繊維を大量摂取させると、盲腸や大腸が肥大することが知られている(武田 1995)。本研究も GL 群の盲腸の肥大と CH 群、CE 群の大腸の肥大が観察された。これは小腸を通過し盲腸や大腸に送り込まれる未消化物の量に左右されて適応的に変化したものと考えられる。食物繊維あるいは未消化物の保水性やゲル形成能などの物理的・化学的特性によって、消化管腔内に存在する外因物質のいわゆる‘カサ(bulk)’が異なり、従って、腸内

通過の様相が異なる。グルコマンナンのような水溶性食物繊維は盲腸に滞留し、盲腸の肥大を促し、一方、キトサンやセルロースのような不溶性食物繊維は大腸に滞留するため大腸の肥大が目立つものと考えられる。しかしながら、盲腸、大腸などの肥大がどのような生理的意義をもつかは現在のところ明らかではない。

食物繊維の摂取によるカルシウムの腸管吸収阻害及び負の出納を示す報告が幾つかなされている(Cumming 1978, Slavin 1980, Bagheri 1985, Coudray 1997)。キトサンはアミノ基を有するカチオン性の高分子多糖類であり、キレート作用(chelate)や吸着作用などによるミネラル吸収を抑制すると考えられる。Gordon と Willford らの実験では、キトサンが *in vivo* と *in vitro* でミネラル吸収を抑制し(Gordon 1983)、Deuchi らはキトサン添加食をラットに2週間与えたところ、キトサン群の糞中カルシウム排泄量の有意な増加が認められ、キトサン群のカルシウム吸収量がセルロース群の60~70%しかなかったことを報告した(Deuchi 1995)。カルシウム吸収阻害が長期間続くと、骨量の減少を引き起こす可能性が想定されるが、食物繊維を長期間摂取させるとカルシウムの尿中排泄量などが抑制されるなどして生体が適応現象を示し、カルシウム出納はやがて平衡になるとの報告(Coudray 1997)もある。桑野らは、5%のイセイエビキチンとオキアミキチンを用いて、正常のラットにおけるカルシウムの利用性に対する影響を検討した結果、ラットの糞中カルシウム排泄量が増加したが、尿中排泄量が逆に低減することを報告した(桑野 1987)。しかし、キトサン投与の骨量への影響は調べられていない。それらの実験に対して、キトサンの長期摂取が卵巣摘出ラットに対する骨密度、骨強度などについて検討した報告は我々が初めてである(楊 2001)。本研究でキトサン摂取は骨密度、骨強度および骨塩量の急激な低下をもたらしたことが認められた。これはキトサン投与によって食事性カルシウムの消化管内吸収阻害による結果と考えられる。骨は、生体を支える支持組織および体内の重要器官を保護する硬組織として重要な役割を果たしていると同時に、体内のカルシウムの貯蔵庫としても機能している。カルシウムの吸収阻害によって、血中カルシウムレベルが低下すると、副甲状腺機能が亢進

し、分泌された甲状腺ホルモンが破骨細胞を増加させて骨吸収を促進し、血液中にカルシウムを放出して血中カルシウム濃度を上昇させる(木村 1994)。本研究のキトサン群における骨量減少は骨吸収が骨形成よりも促進されるアンカプリング状態が長く続くことによってもたらしたものと推察される。キトサンによるカルシウム吸収阻害作用の機構についてはいまだ明らかではないが、いくつかの原因が推測される。桑野ら(1987)は消化管内における食物塊の体積がキトサンにより大きくなり、カルシウムと消化管壁との接触機会を減少させると報告しており、Cassidy ら(1981)の走査電子顕微鏡を用いた観察では、食物繊維を大量に摂取されたラットは小腸粘膜吸収上皮細胞表面が損傷を受けることを示している。また、十二指腸粘膜には腸管からのカルシウム吸収に重要な役割を果たしているカルシウム結合タンパク質(CaBP)が存在している。小腸粘膜吸収上皮が損傷を受けると、この CaBP も減少することが推測され、腸管でのカルシウム吸収が低下すると考えられる(Oku 1982)。キトサンは上述の作用が単独もしくは複合してカルシウムの吸収に影響を与えるものと考えられるが、今後詳細な検討が必要と考えられる。

現在、キトサンは女性の間で、肥満を予防するダイエット補助食品として広く用いられているが、長期摂取による体に対する影響についてほとんど研究されていない。我々はキトサンのコレステロール低下作用と体脂肪蓄積抑制作用を再確認したと同時に、キトサンの長期摂取が骨密度の低下を引き起こすことを見出した。

キトサンは卵巣摘出ラットにおいて血清総コレステロール低下作用と体脂肪の蓄積を抑制する一方、骨密度と骨強度を減少させ、骨粗鬆症の進行を助長する可能性を新しく見出した。これから、キトサンをダイエット補助食品として長期摂取する際には、骨量低下を予防する方法の発現及び骨量低下機構の解明が今後の課題である。

第3章 キトサンの長期摂取が引き起こす卵巣 摘出ラットの骨量減少機構

緒言

前章でキトサンの長期摂取が卵巣摘出(OVX)SHRSP ラットの血清総コレステロールを低下させると同時に骨量の低下を引き起こすことを報告した。キトサンの長期摂取が卵巣摘出ラットの骨量低下を引き起こすとの報告は我々が初めてである(楊 2001)。骨は、たんぱく質(コラーゲン)を主体とする有機基質とリン酸カルシウムを主体とする無機質を主成分として形成されている。骨ミネラルの大部分はカルシウムとリンで占められている。従って、これら栄養素の不足は骨量低下の大きな原因の1つといえる(塚原 2001)。また骨は、その形態と強度を維持しつつ、血清カルシウム濃度を維持するために、常に骨吸収と骨形成、すなわちリモデリングを繰り返している。骨リモデリングにおける骨吸収と骨形成との間の平衡(カップリング)が破綻すると、骨量や骨強度の低下がもたらされる。この骨量変化の機構には様々な因子が複雑に関与する。一方、炭水化物系のポリマーが大部分を占める食物繊維は保水性、ゲル化能、吸着作用、キレート作用などを発現させる物理化学的特性を有し、消化管腔内でこれらの特性により食物成分や内因性物質の消化吸收速度遅延、吸収阻害あるいは消化管上皮組織の損傷を引き起こし、結果的に生体の生理、生化学的狀態や組織の構造にも影響を与える(武田 1995)。キトサンはアミノ基を有するカチオン性の高分子多糖類であり、キレート作用や吸着作用などによるカルシウムの吸収を抑制すると考えられる。実際、キトサン摂取によるカルシウムの腸管吸収阻害を示す報告が幾つかなされている(桑野 1987, Deuchi 1995)。また、キトサンのポリカチオンの性質を考えると、リンの生体利用効率を低下させる可能性が大きいのではないかと推定される。

現在、キトサンは肥満、高脂血症などの生活習慣病に対する予防効果が期待される機能性食品因子である。キトサン摂取による骨量減少を予防するため、骨量減少の機構を解明する必要がある。そこで、本研究はキトサン摂取による骨量低下の機構を解明する目的で、前章での実験同様、卵巣摘出 SHRSP ラットを用いて投与実験を行い、キトサンの長期摂取

がカルシウムとリンの出納、骨吸収量を示す骨代謝マーカー、血清骨代謝関連ホルモンの応答及び十二指腸ビタミン D レセプター(vitamin D receptor; VDR)、ビタミン D 依存性カルシウム結合タンパク質(vitamin D dependent calcium binding protein 9K; CaBP D9K)mRNAs 発現に及ぼす影響を検討した(実験 1)。またリンの腸管吸収量の減少が体内カルシウムの排泄を高める可能性が認められたので、リン量を低下させた飼料を卵巣摘出ラットに投与した場合のカルシウムとリンの出納を調べた(実験 2)。更に、近年では、食物繊維が腸内発酵産物である短鎖脂肪酸などの有機酸を介して、カルシウムなどのミネラル腸管吸収に好影響を与えるとの報告(Demigne 1989, Levrat 1991, Coudray 1997)を考慮に入れて、キトサン投与が盲腸内有機酸の種類と量に及ぼす影響についても検討を行った(実験 3)。

方法

実験 1

1. 実験動物及び飼育方法

4 週齢雌 SHRSP ラット(脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット、船橋農場(株))13 匹を市販固形飼料(MF、オリエンタル酵母(株))で 12 週齢まで飼育後、卵巣摘出手術(OVX)を施し、体重が等しくなるようセルロース 10%投与群(CE)、キトサン 10%投与群(CH)の 2 群に分けた。ラットは個別の金網ケージに入れて室温 24 ± 2 、湿度 $50\pm 5\%$ 、21 時消灯、7 時点灯の恒温室で飼育し、飼料は AIN-93M の組成に基づき、カルシウムの含有量を 0.1%にした低カルシウム飼料とし(Table 2-1-1)、飲料水(蒸留水)と共に 6 週間自由摂取した。各ラットの体重は週 1 回測定し、飼料摂取量は 1 日おきに測定した。

2. 飼料採取と処理

飼育第 6 週目の 4 日間ラットを個別に代謝ケージに移し、糞尿を分離採取して、カルシウム及びリンの出納を調べた。糞採取マーカには、カルミンを用い、飼料中に 0.1%添加した。尿は、5N 塩酸 10mL 入のプラスチック製ポリビンに採取した。採取後、蒸留水で 250mL とし、No.7(無灰分)濾紙にて濾過後、分析試料とした。また、実験終了 2 日前に飼料を通常通りに与えながら 24 時間尿を採取し、尿中デオキシピリジノリン(DPD)の測定に供した。飼育終了後、一夜絶食させたラットをペントバルビタールナトリウム麻酔下において開腹し血液を採取した後、遠心分離により血清を得、ミネラル、骨代謝マーカー、カルシウム調節ホルモンの測定に当てた。その後直ちに十二指腸を摘出し、VDR 及び CaBP D9K mRNA の発現に供した。肝臓、子宮、脂肪組織(後腹壁ならびに腎周辺)を摘出し重量の測定を行った。骨試料は左右大腿骨、第 4 腰椎(L4)を摘出し、軟組織を除去後、測定まで生理食塩水に入れ-30 で保存した。

3. 血清生化学検査

血清中アルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase, ALP)活性測定にはアルカリ性ホスファ B - テストワコー(和光純薬(株))を用いた。ALP は体内緒器官に広く分布し、その起源は造骨組織に由来するものが多いとされている。骨由来の ALP は骨芽細胞が活発に分裂する際に分泌されるため、骨形成を反映する指標として利用されているが、今回用いた方法は骨由来 ALP だけを選択的に測定しているわけではないので、必ずしも骨形成動態を正しく反映しているとは言えないが、その相対的尺度として十分に使用できると考えられる。

骨吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリン(DPD)は EIA 法(Osteolinks-DPD, MetraBiosystems Ltd., Whwatley, Oxon., U.K.)を用いて測定した。DPD は骨基質の有機成分の約 90%を占める I 型コラーゲンの分子間において架橋を形成し、コラーゲン繊維の安定性に寄与している架橋物質である。骨破壊時のコラーゲンの分解に伴い骨外へ放出されるが、体内では代謝を受けず尿中に排泄されるため、尿中の DPD 量の測定は骨吸収の状態を評価するための指標として広く用いられている。血清カルシウム、リン及びマグネシウム(Mg)濃度はそれぞれ市販の臨床用キット、カルシウム C - テストワコー、ピ - テストワコーとマグネシウム B - テストワコー(和光純薬(株))にて測定した。血清 $1,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3(1,25(\text{OH})_2\text{D}_3)$ はradioimmunoassay 法(TFB, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ RIA Kit, Immuno Diagnostic System Ltd., Boldon, U.K.)を用いて測定した。血清副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)は EIA 法(Biotrak parathyroid hormone, rat, ELISE system, Amersham Pharmacia Biotech K.K., U.S.A.)にて測定した。

4. 飼料及び糞中カルシウムとリンの測定

飼料及び糞については、凍結乾燥を行った後、硝酸及び過塩素酸を加え、湿式灰化を行い、原子吸光法(原子吸光分光光度計、日立 7130 型)によりカルシウムを定量した。糞中リン排泄量、尿中カルシウムとリン排泄量も血清と同様の方法で測定した。カルシウムとリ

ンの出納は次式より算出した。

吸収量(mg/4d) : 摂取量 - 糞中排泄量

吸収率(%) : (摂取量 - 糞中排泄量) ÷ 摂取量 × 100

保留量(mg/4d) : 摂取量 - (糞中排泄量+尿中排泄量)

保留率(%) : [摂取量 - (糞中排泄量+尿中排泄量)] ÷ 摂取量 × 100

5. 骨試料測定法

大腿骨および第 4 腰椎の骨密度は第 2 章と同様に DEXA 法にて測定した。大腿骨骨強度は 3 点曲げ試験法により、小動物用骨強度試験機 TK-252C(室町機械)を使用してプランジャースピード分速 5mm、サンプルホルダー間隔 12mm の条件で計測し、第 4 腰椎骨は同様にプランジャースピード 5mm で圧縮試験を行った。骨強度(stiffness, N/mm)は破断時にかかっていた最大荷重(Ultimate strength, N)を破断までにたわんだ距離(Distance, mm)で割ることにより算出した。

骨中成分分析は第 2 章と同様に灰化した後に行った。灰化した大腿骨は試験管に移し、4mL の濃塩酸で溶解した。さらに蒸留水で 100mL にメスアップし、その一部を血清チューブに移し、カルシウム、リン量測定まで保存した。カルシウム、リン含有量を血清と同様の方法で求めた。

6. 十二指腸からの RNA 抽出および逆転写反応による Complementary DNA (cDNA)の合成

十二指腸からの RNA 抽出は acid guanidium-phenol-chloroform (AGPC)法より行い、全て氷上で操作した。摘出した十二指腸は PBS (phosphate-buffered saline)にて十分洗浄した後、ハサミで細かく切り、500 μ l の RNAzol(guadine thiocynante 4M, 2-metracptoethanol 0.1M and phenol, TEL-TEST, INC., U.S.A.)を加えさらにホモジェナイズした。ホモジェナイズ溶液をエッペンドルフチューブ(1.5mL)に移し、50 μ l のクロロホルムを加え攪拌し、氷上にて 5 分処

理した後 4 の 12000g×15 分間遠心した。上清(RNA 層)をエッペンドルフチューブに移し、イソプロピルアルコール 250 μ l を加え攪拌し、氷上にて 15 分処理した後、さらに 4 で 12000g×15 分間遠心し、RNA pellet を得た。その後 75%エタノールを 1mL 加え転倒混合洗浄した後、cDNA 合成時まで冷凍保存(-80)した。

RNA からの cDNA 合成には、First Strand cDNA Synthesis Kit(Pharmacia Biotech, U.S.A.)を用いた。RNA pellet は室温にて 15 分間乾燥した後、10 μ l の DNase/Rnase を含まない純水で溶解し、total RNA の量は分光光度計を用いて 260 μ m における吸光度を測定することにより求めた。逆転写反応は Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV)の逆転写酵素を含む反応液(45mM Tris(pH8.3), 68 mM KCl, 15mM DTT, 9mM MgCl₂, 0.08mg/ml BSA, 1.8 mM dNTPS, 0.2 μ g random hexamer)を用いて 37 にて 1 時間行った。

7. Semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR)

PCR に用いた VDR, CaBP D9K, GAPDH(glyceraldehydphosphate dehydrogenase)のプライマーの塩基配列および products サイズを Table 2-1-2 に示す。PCR には rTaq DNA Polymelase(Sigma chemical CO., U.S.A.)を用いた。最終濃度が Tris-HCL-10mM, KCl-50mM, MgCl₂-10mM, dNTPmix-200 μ M, プライマー-0.25 μ M, rTaq-0.25U となるよう調整し、この mix19 μ l に 1 μ l の cDNA を加えて総 20 μ l の反応液で PCR を行った。Thermocycle の増幅反応条件は 94 30 秒間の denaturation, 53 (VDR, GAPDH), 51 (CaBP D9K)1 分間の annealing, 72 1 分間の extension であった。なお、VDR および CaBP D9K は 24 サイクル、GAPDH は 26 サイクルであった。また、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を遺伝子発現の指標とし定量した。

PCR 産物は、2.5%アガロースゲルで電気泳動した。泳動後、エチジウムブロマイド液で染色し、紫外線下で発光させ発光強度を求めた。また、GAPDH との比を取るため、同一ゲル上で同一ローディング量を用いた。

解析には Biomax 1D image analyze software(Kodak, U.S.A.)を使用した。

実験 2

1. 実験動物および飼育方法

実験動物は 12 週齢の SHRSP 雌ラット(船橋農場(株))12 匹を使用した。ラットは卵巢摘出手術(OVX)を施し、体重が等しくなるよう食物繊維無添加 0.3% リン投与群(P 群)、0.1% リン投与群(LP 群)の 2 群に分け、飼料は AIN-93M の組成に基づき、カルシウムの配合比 0.5% を 0.1% に下げ、さらに飼料中のリン含量が 0.1%(P 群)または 0.3%(LP 群)になるように KH_2PO_4 で調整した(Table 2-2-1)。各ラットの体重は週一回測定し、飼料摂取量は 1 日おきに測定した。ラットの飼育条件は実験 1 と同様であった。

2. 飼料採取と処理

飼育期間終了直前の 4 日間代謝ケージにてラットごとに尿を採取した。尿は、5N 塩酸 10mL 入りのポリビンに採取した後、蒸留水で 250mL とし、No.7(無灰分)濾紙にて濾過後、カルシウムおよびリン含有量の測定に供した。飼育終了後、一夜絶食させたラットをペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血し、臓器を摘出し、重量測定を行った。血液は遠心分離して血清を得、カルシウムとリン濃度の測定に当てた。

3. 分析方法

尿中カルシウム、リン含有量および血清中カルシウム、リン濃度の測定方法は実験 1 と同様であった。

実験 3

1. 実験動物および飼育方法

実験動物として、12週齢雌 SHRSF ラット 18 匹に OVX を施し、体重が等しくなるよう食物繊維無添加群(FF)、セルロース 10%投与群(CE)、キトサン 10%投与群(CH)の 3 群に分け、飼料及び蒸留水を 6 週間自由摂取させた。実験試料は AIN-93M(Ca 0.5%)に準拠したが、Ca の配合比は 0.1%に下げたものを使用した(Table 2-3-1)。ラットの飼育条件は実験 1 及び実験 2 と同様であった。

2. 飼料採取と分析方法

飼育期間終了後、ラットをペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血屠殺した後、直ちに回盲接合部および盲腸と結腸の接合部および腸間膜の血管を結紮し、盲腸を内容物を含んだまま盲腸を摘出した。なお、実験の趣旨から絶食させることなしにラットの処置を行った。摘出した盲腸をハサミで切開し、内容物の一部を直ちに pH の測定に当て、残りの内容物をエッペンドルフチューブに入れ、水分量と有機酸含量の測定に供した。pH の測定について、盲腸内容物約 100mg をサンプリングし、コンパクト pH メーター(compact pH meter, twin pH, 堀場製作所)の平板電極上に塗布し、pH の測定を行った。盲腸内水分含量の測定は、凍結乾燥により行った。凍結乾燥後、重量の測定を行い、乾燥前の値と比較し、その値を水分含量とした。盲腸内有機酸含量の測定は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法にて行った。盲腸内容物約 200mg を 2.0mL エッペンドルフチューブにサンプリングし、5 倍量の蒸留水を添加して、均質化した後、遠心分離(12000 rpm × 15 min, 4℃)を行い、上清を採取した。本上清 0.9mL に 10%過塩素酸溶液 0.1mL を添加し、4℃ で一夜放置した。過塩素酸処理後、遠心分離(12000 rpm × 15 min, 4℃)に供した。上清をフィルター(0.45 μm、GL クロマトディスク、イオンクロマト系、ジーエルサイエンス(株))を用いて濾過し、HPLC による測定に供した。HPLC の条件は以下の通りとした。

カラム：Shodex KC-811(昭和電工(株)、東京) × 2

溶離液：3.75mM 過塩素酸溶液+1.75% アセトニトリル

pH 調整剤：3.75mM 過塩素酸溶液+1.75% アセトニトリル+15mMTris

流速：1.0mL/min.

検出器：電導度検出器(waters 432 conductivity Detector)

カラム温度：42

セル温度：45

波形解析ソフト：ミレニアムソフトウェア(Waters)

統計的処理

測定値は、平均値 ± 標準誤差で示した。全ての統計処理は市販ソフトウェア「SPSS Version 9.0」を使用して分散分析を行い、平均値の差の検定は LSD 型の多重比較法を用いて有意水準 5% 未満($P < 0.05$)で検定した。

結果

実験 1

1. 飼料摂取量、体重、臓器重量

飼料摂取量、体重増加量(body weight gain)及び各臓器重量について群間の差は見られなかった(Table 2-1-3)。

2. 骨性状

大腿骨及び第 4 腰椎の BMD、骨強度、カルシウムとリンの含有量を Fig. 2-1-1 に示す。CE 群に比べて CH 群の大腿骨 BMD で 8%($P<0.001$)、骨強度で 14%($P<0.05$)、カルシウム含有量で 8%($P<0.001$)、リン含有量で 4%($P<0.01$)、それぞれ有意な減少を示した。また、CE 群に対して CH 群では第 4 腰椎 BMD で 13%($P<0.01$)、骨強度で 26%低下し、大腿骨の結果と同じ傾向が認められた。

3. カルシウム及びリン出納

飼育期間中、第 6 週目の 4 日間代謝ケージにてラットごとに糞尿を分離採取し、カルシウム、リンの出納を調べた。Table 2-1-4 にカルシウム及びリンの出納を示した。カルシウム摂取量とカルシウム糞中排泄量については CE 群と CH 群の間で差は見られなかった。CH 群のカルシウム吸収率(%)は CE 群に比べてやや高くなる傾向が認められた(43.3 ± 2.8 vs 38.4 ± 2.2 , NS)。CH 群のカルシウム吸収率は CE 群より高い傾向にあったが、CH 群の尿中カルシウム排泄量(mg/4d)が有意に増加したために(12.6 ± 0.6 vs 5.2 ± 0.3 , $P<0.001$)、カルシウムの体内保留率(%)では CE 群に比べて有意な低値を示した(19.0 ± 3.1 vs 27.3 ± 2.0 , $P<0.05$)。

CE 群のリン摂取量は CH 群に比べて有意に多くなった。これは本実験に使用しているセルロースにリンが含まれていたためと思われる。CH 群のリン摂取量は CE 群より有意に少

なかったものの、糞中リン排泄量(mg/4d)は CE 群に比べて有意に増加した(42.3 ± 2.1 vs 32.4 ± 2.5 , $P < 0.05$)。尿中リン排泄量では、CE 群と CH 群の群間差は見られなかった。CH 群のリン吸収率(78.5 ± 1.1 vs $87.6 \pm 0.8\%$, $P < 0.001$)およびリンの体内保留量(mg/4d)は CE 群に比べ、有意な低下が見られた(71.8 ± 4.8 vs 145.4 ± 5.2 , $P < 0.001$)、リンの生体利用性がキトサン摂取によって著しく低減することが明らかにされた。

4. 血清生化学検査

尿中カルシウム排泄量が多かった CH 群の血中カルシウム濃度は CE 群より有意に低下した($P < 0.05$, Table 2-1-5)。それに対して、CH 群では、血中リン濃度(mg/dL)は CE 群に比べ生体利用効率が顕著に低いにもかかわらず有意な高値を示した(6.7 ± 1.1 vs 4.0 ± 0.8 , $P < 0.05$)。血中マグネシウム濃度について群間差は見られなかった。

5. 骨代謝マーカー及びカルシウム調節ホルモン

骨代謝マーカー及びカルシウム調節ホルモンの測定値を Table 2-1-6 に示す。血清 ALP 活性 (IU/L) は CE 群に比べて CH 群で有意な低下が認められ、骨形成が CH 投与で減退することを窺わせた(67.8 ± 2.9 vs 142.7 ± 20.1 , $P < 0.001$, Fig. 2-1-2)。24時間尿中 DPD 濃度について、CH 群では CE 群に比べやや高い傾向を示したが有意差は認められなかった(Fig. 2-1-2)。

血清 PTH 濃度では、CH 群で CE 群に比べて 43% 上昇したが、有意差が認められなかった(Fig. 2-1-3)。腸管でのカルシウム吸収を促進する $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度(pg/mL)が CH 群では CE 群に比べ約 3.5 倍有意に高くなり、体液カルシウムの恒常的不足をきたしていることが示された(359.7 ± 18.6 vs 102.4 ± 12.7 , $P < 0.001$, Fig. 2-1-3)。

6. 十二指腸の VDR 及び CaBP D9K mRNAs 発現

十二指腸の VDR 及び CaBP D9K mRNAs 発現は PCR 法にて定量した。十二指腸での VDR

及び CaBP DPK mRNAs 発現はハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量にて半定量的に算出し、Fig. 2-1-4 に次章で検討するビタミン C 添加効果の結果と併せて示す。CH 群では CE 群に比べ VDR 及び CaBP DPK mRNAs の有意な上昇が認められ、CH によるビタミン D 栄養状態の低下ないしは小腸上皮組織の損傷に伴うカルシウム吸収能の減少は見られないことが判明した($P < 0.05$, Fig. 2-1-4)。

実験 2

1. 飼料摂取量、体重、臓器重量

飼育期間中の飼料摂取量について、LP 群は P 群よりやや高いが、有意差が見られなかった。実験開始時体重と最終体重の差から体重増加量を求めると、飼料摂取量の結果と同傾向が見られ、LP 群が P 群に比べ有意な増加が認められた($P < 0.05$, Table 2-2-2)。肝臓、腹腔内脂肪および子宮重量は群間差が見られなかった。

2. 血清カルシウム、リン濃度及び尿中カルシウム、リン排泄量

血清カルシウム及びリン濃度は群間の差が見られなかった(Table 2-2-3)。P 群に比べて LP 群の尿中カルシウム排泄量が有意な高値を示し、リンの生体利用効率の低下は内因性カルシウムの尿中排泄を増加させることが確認された(7.4 ± 1.5 vs 13.6 ± 1.4 , $P < 0.05$, Fig. 2-2-1)。尿中リン排泄量では、尿中カルシウム排泄量と同じ傾向を示し、LP 群が P 群より有意に高くなった(42.9 ± 1.8 vs 60.6 ± 2.7 , $P < 0.001$, Fig. 2-2-1)

実験 3

1. 飼料摂取量、体重、臓器重量

体重、飼料摂取量および臓器重量の結果を Table 2-3-2 に示す。CE 群の飼料摂取量は最も高く、FF 群に比べ有意に増加した($P<0.05$)。体重増加量も同傾向が見られたが、群間の差は認められなかった。また、肝臓、腹腔内脂肪および子宮重量も群間に差が認められなかった。

2. 盲腸内容物有機酸含量、水分量及び pH

CH 群の酢酸、プロピオン酸は FF 群及び CE 群と比較して有意に増加し CH は腸内菌叢による異化を CE より受けやすいことが示された(Table 2-3-3)。総有機酸濃度も CH 群が最も多く、FF 群に比べると有意な高値を示した($P<0.01$)。水分量では、CE 群が FF 群に比べ有意に低値を示し($P<0.001$)、CH 群が CE 群及び FF 群より有意に高くなった($P<0.05$ vs FF, $P<0.001$ vs CE)。CH 群の総有機酸は CE 群及び FF 群に比べて有意な増加が見られたが、盲腸内容物の pH は CH 群で CE 群及び FF 群に比べ有意に高値を示し、CH 投与が盲腸カルシウムの吸収を促す可能性は少ないものと思われる(7.40 ± 0.08 vs 6.98 ± 0.18 (FF), 6.86 ± 0.12 (CE), $P<0.05$ vs FF, $P<0.01$ vs CE)。

考察

前章でキトサンの長期摂取は閉経後女性モデルである卵巣摘出 SHRSP ラットにおいて血清総コレステロールの上昇を抑制する一方、骨密度と骨強度を減少させ、骨粗鬆症の進行を助長する可能性があることを新たに見出した。本研究ではキトサン摂取による骨量低下の病態生理と発現機構を解明するため、骨のリモデリング状態、カルシウムの生体利用性と体内動態に与える影響を骨代謝マーカー、出納試験を用いて検討した。また、カルシウム吸収に関連する十二指腸ビタミン D レセプター(VDR)、ビタミン D 依存性カルシウム結合タンパク質(CaBP D9K)mRNAs の発現および盲腸有機酸に対するキトサン摂取の影響についても検討した。

本研究でも前章での実験同様、キトサン摂取が OVX SHRSP ラットの大腿骨骨密度、骨強度、カルシウムおよびリン含有量、第 4 腰椎骨密度、骨強度の有意な低下を引き起こした。キトサンはアミン基を有するカチオン性高分子多糖類であり、キレート作用や吸着作用などによるカルシウムの吸収を抑制すると報告されている(Gordon 1983, Deuchi 1995)。我々は当初キトサン投与による骨量の低下はキトサンが小腸からのカルシウムの吸収を抑制し、結果的に体内カルシウムの不足を引き起こすことにより発現すると想定して、キトサンの長期摂取がカルシウムの腸管吸収と体内保留に及ぼす影響を出納試験を用いて検討した。本研究では、キトサン 10%を含む飼料をラットに 6 週間自由摂取させ、第 6 週目の 4 日間代謝ケージにてラットごとに糞尿を分離採取し、カルシウムおよびリンの出納を調べた。その結果、Table 2-1-4 に示したように、CH 群と CE 群の糞中カルシウム排泄量およびカルシウム吸収率においては有意差が認められなかったが、CH 群の尿中カルシウム排泄量は CE 群のそれに比べ、約 2.4 倍と大幅に増加し($P < 0.001$)、体内保留率においても有意に減少した($P < 0.05$)。これらの成績から判断すると、キトサンによる骨量減少はカルシウムの吸収が阻害されるのではなく、尿中へのカルシウムの排泄が促進されることに基づいて起こる

ことが示唆された。この結果は Wada ら(1997)の結果と一致している。Wada らは ^{47}Ca を使ったカルシウム代謝試験において、キトサン 5%投与では、カルシウムの腸管吸収阻害は起こらなかったが、尿中カルシウム排泄量が増えた結果、体内の ^{47}Ca 保留量が有意に低下したと述べている。尿中に排泄されるカルシウムは主として骨から血液中に動員されたカルシウムに由来するので、骨吸収の間接的な指標になるといわれている(Nordin 1976)。本研究が示されたキトサン摂取に伴う高カルシウム尿症は、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン(DPD)濃度が CE 群に比べて CH 群で高くなる傾向が見られたこと(Fig. 2-1-2)から、骨吸収の著明な亢進、すなわち骨塩溶出増加によりもたらされたものと思われる。また、CH 群の血中カルシウム濃度は CE 群に比べ有意に減少した($P<0.05$)が、キトサン摂取に伴う尿中カルシウム排泄が骨吸収による血液へのカルシウム補給を上回る速度で進むことを示唆するものであり、後述するリンの相対的不足が腎尿細管からのカルシウムの再吸収を低下させる可能性も考慮する必要がある。さらに、CH 群では血中 PTH 及び活性型ビタミン $\text{D}(1,25(\text{OH})_2\text{D}_3)$ 濃度の顕著な上昇も見られた。PTH は血中カルシウム濃度の低下時に分泌が高まり、腎臓において $25(\text{OH})\text{D}$ から活性型ビタミン $\text{D}(1,25(\text{OH})_2\text{D}_3)$ への合成反応に係わり、生成した活性型ビタミン D が腸管からのカルシウムの能動的吸収に重要な働きをする。PTH はまた、骨において骨芽細胞を刺激して破骨細胞の活性を高めることにより骨吸収を亢進させる(千勝 1999)。本研究でキトサン摂取が PTH の分泌を促した直接的原因は、キトサンが間接的に骨からの動員を上回る速度で尿中へのカルシウム排泄量を増加させたことに起因して血中カルシウム濃度が低下したためであるが、PTH の分泌亢進はキトサン摂取が恒常的な体内可溶性カルシウムプールを小さくしていることの反映でもあり、事実活性型ビタミン D の血中濃度が 3.5 倍もの上昇を示している。従って、キトサン摂取による骨量減少は PTH が骨吸収を促進し、恒常的に骨吸収が骨形成を上回る速度で進行した結果として発現したものと推定される。

本研究では、キトサン摂取によるカルシウムの尿中排泄増加の原因を特定するには至ら

なかったが、リンの出納結果から次の様な原因による可能性が示唆された。すなわち、CH 群の糞中リン排泄量が CE 群より有意に高く ($P < 0.05$, Table 2-1-4)、一方でリンの吸収率および体内保留率は CE 群に比べて有意に低下した ($P < 0.001$) ことから、リンの生体利用性がカチオン性高分子多糖類であるキトサン摂取によって減少し、カルシウムとリンの濃度バランスが崩れたことが関与すると考えられる。いずれにせよ、キトサンがリンの糞中排泄量を増大させることは確かであり、Baxter ら (2000) もラットに 1% のキトサン添加飼料を 30 日間与えたところ、キトサン投与群の糞中リン排泄量が対照群に比べ有意に増加したと報告している。リンはカルシウムとともに骨の主構成成分であり、リン酸カルシウムという形で骨に存在し、キトサン摂取によってリンの腸管吸収が阻害されると、体内に利用できるリンが減少するため、骨から血中にリンとカルシウムを放出し、余分なカルシウムは尿中へ排泄されると考えられる。この仮説を検証するために、実験 2 で、食物繊維の影響を排除し、リンの摂取低下が尿中カルシウム排泄量を増加させるか否かを検討した。その結果、低リン (0.1%) 投与群 (LP 群) の尿中カルシウム排泄量は 0.3% リン投与群 (P 群) に比べ、有意な増加が認められ、実験 1 と類似した結果が得られた ($P < 0.05$, Fig. 22-1)。しかし、低リン食の投与は尿中カルシウム排泄量だけではなく、尿中リン排泄量の有意な増加ももたらされ、食事のリン欠乏は体内のカルシウム及びリン代謝に影響を及ぼすことが示唆された。その一方、本研究の結果と一致している Wada ら (1997) はキトサンが腸内細菌によって発酵されて生じた発酵産物が体内に吸収され、これらの産物が骨からのカルシウム動員を刺激する可能性を示唆した。カルシウム代謝に及ぼすキトサン摂取の影響について、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。

先行研究の多くはキトサンがカルシウムの腸内吸収を抑制し、カルシウムの糞中排泄量を増加させることを報告した。我々もこのような現象を想定して出納試験を行ったが、CE 群と CH 群の糞中カルシウム排泄量とカルシウム吸収率について有意差が見られなかった (Table 2-1-4)。今までの先行研究はいずれも通常ラットを使用した 2 週間以内の短期間にお

ける検討であったため、我々の結果との相違は、飼育期間、ラットの種類の違いによって生じるものと思われる。本研究では、CH群の血中カルシウム濃度が有意な低下を示し、カルシウム調節ホルモンであるPTHおよび $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が有意に上昇した。腸管からのカルシウム吸収には異なった2つの機構が配備されている。一つは十二指腸から小腸上部(duodenum and jejunum)において行われる能動輸送であり、もう一つは小腸下部(ileum)にかけて行われる拡散輸送である。前者は活性型ビタミンDやカルシウム結合タンパク質(CaBP)が関与する。本研究では、CH群の血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度がCE群に比べ有意に増加したことから、VDR及びCaBPに影響を及ぼす可能性が示唆された。

小腸上部での能動輸送はビタミンD依存性カルシウム結合タンパク質(CaBP D9K)の存在が必要とされている(Bronner 1986)。活性型ビタミンDはビタミンDレセプター(VDR)を介してCaBP D9Kの合成を促進し、カルシウムの腸内吸収に貢献する(Henry 1984, Pike 1991)。本研究では、十二指腸VDR及びCaBP D9K mRNAはRT-PCR法を用いて測定された。その結果、CE群の血中活性型ビタミンD濃度がCE群より約3.5倍も有意に高く、十二指腸のVDRおよびCaBP D9K mRNAも有意に増加した($P < 0.05$)。これらの成績から、本研究でキトサン摂取がカルシウムの腸管吸収に影響を及ぼさなかった理由は、VDRおよびCaBP D9K mRNAの増加によってカルシウムの能動輸送が促進されることによると思われる。

一方、最近では大腸に達した食物繊維などの未消化物は、大腸内の腸内細菌により発酵され、短鎖脂肪酸(SCFA)などの有機酸の生成によってカルシウムなどのミネラル吸収を促進すると報告されている(Demigne 1989, Levrat 1991, Coudray 1997)。腸管から吸収できるカルシウムはイオンの形で存在するカルシウムのみである。食事より摂取するカルシウムは必ずしもイオンの形でなく、化合物(塩)の形である場合が多い。食物が胃で消化される際胃液が強酸性であることからすべてのカルシウムは一次的にイオンの形になるが、十二指腸に移動して吸収される時点では、膵液の分泌によって弱酸性から中性域になり、カルシウムイオンは塩を形成するようになる。従って、消化管の中で、いかにカルシウムをイオンの

ままで保つことは非常に重要なことである。カルシウムのイオン化を高める方法については腸管内の pH を下げて酸性側にすることである。小腸で消化されない食物繊維は大腸内の腸内細菌により発酵され、有機酸が生成される。これらの有機酸は腸管内の pH を下げ、イオン化カルシウムの濃度を上げ、カルシウムの吸収を促進すると言われている(Remesy 1992)。したがって、食物繊維の一種であるキトサンは腸内細菌の作用により有機酸を生成し、カルシウムの吸収に影響を与える可能性が考えられる。我々はキトサンまたはセルロースを 6 週間摂取したラットの盲腸内有機酸、pH を食物繊維無添加飼料を摂取したラットのそれと比較した(実験 3)。キトサンを摂取したラットの盲腸内酢酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸濃度は FF 群と CE 群に比べ有意な増加が見られ(Table 2-3-3)、総有機酸濃度も CE 群より高い傾向にあり、FF 群に比べ有意な高値を示した($P < 0.01$)。しかし、総有機酸が増加したにもかかわらず、盲腸内容物 pH では逆に CH 群で有意に高かった。盲腸内で生産された酢酸、プロピオン酸は速やかに吸収される(Engelhardt 1995)のに対し、乳酸やコハク酸は吸収されにくい(Umesaki 1979)。乳酸やコハク酸は盲腸内で生成されると管腔内に蓄積しやすく、結果として盲腸内の pH を低下させる(Hoshi 1994)。本研究では、CH 群の盲腸内酢酸とプロピオン酸濃度は有意に高かったが、乳酸やコハク酸は CE 群または FF 群に比べやや少なかったため、盲腸内 pH が低下しなかったと考えられた。従って、実験 1 で CH 群でカルシウム腸内吸収が低下しなかった原因は盲腸内有機酸の増加によるものではないことが示唆された。しかし、キトサン摂取は血中コレステロール低下作用に關与する盲腸内プロピオン酸を有意に増加させることから、第 2 章で見られたキトサン摂取群の血清コレステロールの低下の原因につながると考えられる。

以上の結果から、低カルシウム食投与時のキトサンによる骨量減少はカルシウムの吸収が阻害されるというより、尿中へのカルシウム排泄が促進されることに基づいて起こることが示唆された。また、キトサンによるカルシウムの尿中排泄増加はリンの吸収阻害作用を介して発現する可能性も示された。

第4章 キトサンの長期摂取による卵巣摘出ラットの骨量減少に対するビタミンCまたはカルシウム添加の効果

緒言

第 2 章で長期的なキトサン摂取が閉経後女性モデルである卵巣摘出(OVX)SHRSP ラットの血清総コレステロールを低下させる一方、骨密度と骨強度を減少させ、骨粗鬆症の進行を助長する可能性が示された。そして第 3 章に記したように、キトサン摂取に伴う骨量減少は消化管腔内においてキトサンが飼料由来のカルシウムの吸収を阻害して体内カルシウムの不足を招いたためではなく、内因性カルシウムの尿中排泄を増加させて血中カルシウム濃度の低下をひき起こし、結果的に骨から血中へのカルシウムの動員を高めたことによると考えられる。キトサンは肥満、高脂血症などの生活習慣病に対する予防効果が期待される機能性食品因子である。キトサンの効果を最大限に活用するためには、カルシウムの体内保留を高めることにより骨量減少抑制効果を発揮する食物因子と組み合わせることが重要であり、キトサンによる骨量低下の予防には十分な量のカルシウム摂取あるいはその吸収を高める食物因子の同時投与が有効に働くと思われる。

カルシウムの吸収を向上させる食物因子は、ビタミン D(Erben 1992)、乳糖(Miller 1989)、カゼイン分解産物(Tsuchita 2001)、ミルク中のカルシウム結合タンパク質(Toba 2001)などが挙げられる。一方、Morton ら(2001)による疫学調査の結果は、ビタミン C の補充が閉経後女性の骨量を増加させることを示唆している。ビタミン C は骨芽細胞における I 型コラーゲン合成に必須因子だけではなく、カルシウムの腸内吸収を促進すると報告される(Bourne 1972)。また、ビタミン C は抗酸化物質としてよく知られ、サプリメントやビタミン C 強化食品として広く使われて、手軽に取り入れやすい食物因子である。そこで、本研究では、キトサン摂取による骨量減少がビタミン C もしくはカルシウムの添加により軽減できるか否かを検討した。

方法

1. 実験動物及び飼育方法

実験動物として、4週齢雌 SHRSP ラット 14 匹を、船橋農場(株)から購入して使用した。実験ラットは市販固形飼料(MF、オリエンタル酵母(株))で 12 週齢まで飼育後、卵巢摘出手術(OVX)を施し、体重が等しくなるよう第 3 章の飼料組成に基づき、キトサン 10%+ビタミン C1.5%投与群(CHVC)、キトサン 10%+Ca1%投与群(CHCa)の 2 群に分けた。本実験は第 3 章の実験 1 と同時進行で行い、飼育条件、飼育期間なども同じにした。

2. 飼料採取と処理

第 3 章の実験 1 同様、飼育第 6 週目の 4 日間ラットを個別に代謝ケージに移し、糞尿を分離採取して、カルシウム及びビリンの出納を調べた。飼育終了後、一夜絶食させたラットをネンブータル麻酔下において開腹し血液を採取した後、遠心分離により血清を得、血清ミネラル及びアルカリホスファターゼ(ALP)濃度の測定に当てた。その後直ちに肝臓、子宮、脂肪組織(後腹壁ならびに腎周辺)を摘出し重量を測定した。屠体からは骨試料として左右大腿骨、第 4 腰椎(L4)を摘出し、軟組織を除去後、骨密度および骨強度測定に当てた。全ての測定は第 3 章の実験 1 と同様に行った。

3. 統計的処理

測定値は、平均値±標準誤差で示した。全ての統計処理は市販ソフトウェア「SPSS Version 9.0」を使用して分散分析を行い、平均値の差の検定は LSD 型の多重比較法を用いて有意水準 5%未満($P<0.05$)で検定した。

結果

本実験では、キトサン飼料に対するビタミン C 及びカルシウムの添加効果は第 3 章実験 1 の CE 群及び CH 群の測定値と比較することにより判断した。

1. 体重、飼料摂取量、臓器重量

飼育期間中の飼料摂取量について、低カルシウム(0.1%)食群である CE 群、CH 群、CHVC 群の間に差は見られなかったが、高カルシウム(1%)食の CHCa 群は他の 3 群に比し有意な増加が認められた($P < 0.001$, Table 3-2)。実験開始時体重と最終体重の差から体重増加量(body weight gain)を求めると、飼料摂取量の結果と同傾向が見られ、低カルシウム食群では群間差がなかったのに対し、高カルシウム食群(CHCa 群)では最も高く、CHVC 群に比べ有意な高値を示し($P < 0.05$, Table 3-2)、飼料中カルシウム含有量はラットの飼料摂取量に影響を与えることが示唆された。なお、肝臓、腹腔内脂肪および子宮重量は各群間に差が見られなかった(Table 3-3)。

2. 骨性状

ビタミン C を添加した CHVC 群では CH 群に対して大腿骨カルシウム含有量($P < 0.01$)、リン含有量($P < 0.05$, Fig. 32)と L4BMD($P < 0.05$, Fig. 33)が有意に増加した。一方、カルシウムを添加した CHCa 群の大腿骨 BMD($P < 0.01$ vs CE, $P < 0.001$ vs CH and CHVC, Fig. 3-1)、カルシウム含有量($P < 0.001$, Fig. 3-2)、リン含有量($P < 0.05$ vs CE, $P < 0.01$ vs CHVC, $P < 0.001$ vs CH, Fig. 3-2)および L4BMD($P < 0.001$, Fig. 3-3)は他の 3 群に比べ有意な高値を示した。また、カルシウムの添加によって、大腿骨強度は CE 群レベルまで回復した(Fig. 3-1)。

3. カルシウム及びリン出納

飼育期間中、第 6 週目の 4 日間代謝ケージにてラットごとに糞尿を分離採取し、カルシウム及びリンの出納を調べた。Table 3-4 にカルシウム及びリンの出納を示した。低カルシウム群である CE、CH および CHVC 群において、カルシウム摂取量とカルシウム糞中排泄量については群間に差が見られなかった。CE 群(38.4 ± 2.2)のカルシウム吸収率(%)比べて、CHVC 群(46.2 ± 2.8)は有意な高値を示した($P < 0.05$)。キトサン摂取による尿中カルシウム排泄量の増加はビタミン C の添加によって 12.6 ± 0.6 mg/4d から 8.8 ± 0.7 mg/4d($P < 0.01$)まで低減し、カルシウムの体内保留量も CE 群のレベルまで回復した。

CE 群のリン摂取量は CH 群と CHVC 群に比べて有意に多かった。これは本実験に使用しているセルロースに多量のリンが含まれているためと思われる。CH と CHVC 群のリン摂取量は CE 群より有意に少なかったものの、糞中リン排泄量は CE 群に比べて有意($P < 0.05$)に増加した。尿中リン排泄量では、CE、CH、CHVC3 群の群間差が見られなかった。従って、CH と CHVC 両群のリン吸収率および P の体内保留率は CE 群に比べ、有意な低下が見られた($P < 0.001$)。

一方、CHCa 群ではカルシウム 1 %が添加しているので、ほかの 3 群とカルシウムの出納上では比較できないが、カルシウムの添加によってカルシウムの体内保留量が 5 ~ 8 倍と著しく増加した。リンの出納について、CHCa 群では他の 3 群に対し、糞中リン排泄量が顕著な増加が見られた($P < 0.001$)。尿中排泄量を比べると、糞中排泄量とは逆に CHCa 群の方がほかの 3 群に比べて有意に低く($P < 0.001$)、リン吸収量の悪さを尿中排泄量の低減によって補う様子が窺がえた。結果的に、キトサン摂取群である CH、CHVC、CHCa 群のリンの体内保有率は CE 群より有意に低くなったことから($P < 0.001$)、リンの生体利用性はキトサン摂取によって明らかに低減することが示された。

4. 血清生化学検査

尿中カルシウム排泄量が多かった CH と CHVC 群の血中カルシウム濃度は CE 群より有意

に低下し($P<0.05$, Table 3-5, Fig. 3-4)、キトサン摂取に伴う低カルシウム血症はビタミン C の摂取によっては回復されないことが示唆された。それに対して、CH と CHVC 群ではともに、血中リン濃度が CE 群に比べ有意な高値を示した($P<0.05$, $P<0.01$)。血中カルシウム濃度では CHCa 群と CE 群の間に有意差が認められないことから、高カルシウム飼料の投与でキトサン摂取による低カルシウム血症が改善されることが示された。血中マグネシウム濃度について各群で有意な差は見られなかった。

5. 骨代謝マーカー

骨代謝関連マーカーを Table 3-6 に示す。血清中 ALP 活性は CE 群に比べて CH、CHVC および CHCa 群で有意な低下が認められた($P<0.001$, Fig. 3-5)。24 時間尿中 DPD 濃度について、カルシウム添加群 CHCa 群の DPD は他の 3 群に比べ有意な低値を示し($P<0.01$ vs CE, $P<0.001$ vs CH and CHVC)、高カルシウム食による骨吸収の抑制が示唆された。

考察

骨粗鬆症の予防には、カルシウムの補充効果がよく知られている(Reid 1993, Chevally 1994)。一方、2001年 Morton らによる疫学調査の結果から、ビタミン C の補充が閉経後女性の骨量を増加させることを報告した。本研究では、第 3 章実験 1 と同時期、同条件下で行い、ビタミン C もしくはカルシウムの添加がキトサン摂取による骨量低下を軽減できるか否かについて検討した。

キトサン 10%+ビタミン C 1.5%(CHVC 群)を摂取したラットの大腿骨カルシウム($P<0.01$)およびリン含有量($P<0.05$)がキトサン単独投与群(CH 群)に比べて、有意に増加した(Fig. 3-2)。さらに、CHVC 群の第 4 腰椎骨密度、骨強度はコントロール群である CE 群のレベルまで回復した(Fig. 3-3)。ビタミン C は胃でのカルシウム溶解を助け、カルシウムの腸内吸収を促進すると報告されている(Hungerford 1983)。Deuchi らは 5%のキトサンとともに 1.5%のビタミン C をラットに与えたところ、カルシウムの吸収が有意に増加したことを報告した。しかし、本研究では、カルシウムの吸収について CH 群と CHVC 群の間に差が見られず、ビタミン C による骨量増加はカルシウムの吸収促進によるものではないことが示唆された。Pointillart ら(1997)は豚に餌 1kg 当り 1000mg のビタミン C を与えたところ、カルシウムおよびリンの出納結果はコントロールと差がなかったことを見出し、本研究と同様の結果を報告した。本研究では、キトサン摂取(CH 群)による尿中カルシウム排泄量の増加はビタミン C の添加(CHVC 群)によって 12.6 ± 0.6 から 8.8 ± 0.7 mg/4d ($P<0.01$, Table 3-4)まで低減し、カルシウム保留率も CE 群のレベルまで回復した。また、CH 群と CHVC 群では、リンの出納及び骨代謝マーカーに差が認められなかったことから、ビタミン C は尿中へのカルシウム排泄を抑制することによって骨量減少を軽減することが示唆された。ビタミン C はビタミン C 欠乏動物で見られる骨異常を改善し(Tsuchiya 1994)、動物の骨量を高め(Weiser 1992, Tsunenari 1991)、まだ人間においてビタミン C 摂取量と骨量の間には正の相関が認められる

(Gunnes 1995)ことなどの調査結果が報告されてきた。しかし、その作用機構が現在のところまだ明らかではない。ビタミン C は I 型コラーゲンの合成、オステオカルシンの蓄積を促進することが知られている(Franceshi 1992)。本研究では、オステオカルシンまたは I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド(PICP)を測定していなかったため、ビタミン C 添加群(CHVC 群)で見られる第 4 腰椎骨量の改善は骨基質形成の促進が関与するかどうかは確認できなかった。このことに関してはさらなる研究が必要である。

骨の発育および骨密度を高めるためには、カルシウムは重要な役割を果たすことがよく知られている。本研究では、カルシウム添加群(CHCa 群)の大腿骨骨密度、カルシウムおよびリン含有量(Fig. 3-1, 3-2)、第 4 腰椎骨密度(Fig 3-3)が有意な高値を示し、キトサン摂取が引き起こす骨量減少は高カルシウム食投与により完全に防止できることが確認できた。また、血中カルシウム濃度(Fig. 2-4)では CHCa 群と CE 群間に有意差を認めないことから、キトサン摂取に伴う低カルシウム血症もカルシウムの摂取を高めることで改善されることが示された。また、高カルシウム食投与によって、体内に吸収されたカルシウム量および保留量の顕著な増加が見られ、同時に骨吸収マーカーである尿中 DPD 濃度を有意($P < 0.001$)に減少させることが明らかとなった。しかし、骨形成マーカーである ALP 活性値は CHCa 群で CE 群に比べ有意に低く、高カルシウム食投与は骨形成および骨吸収の抑制、すなわち骨のリモデリングは低代謝回転型に変わることが示された。カルシウムを補充すると、骨吸収と骨形成両方とも抑制され、低代謝回転型になることは既に報告される。Mckane ら(1996)はカルシウムをサプリメントとして与えた閉経後女性の尿中 DPD 濃度がカルシウムを投与しなかった被験者のそれに比べて有意に低下したことを報告した。Slemenda ら(1997)の調査では、骨形成マーカーの一種である血中オステオカルシン(OC)濃度はカルシウム補充群でカルシウム非補充群に比べ有意に低下したことを報告した。このように、カルシウムの補充は骨吸収と骨形成とも低下させるが、骨形成が相対的に骨吸収を上回るため、骨量が増加すると推測されている(Heaney 1994, Lee 1996, Slemenda 1997)。本研究でも、キトサン飼料

にカルシウムを補充すると、骨形成が骨吸収を上回るようになり、結果的に骨量の増加がもたらされたと考えられる。本研究における骨吸収抑制に対するカルシウム補充の効果は増加したカルシウム吸収量が血中カルシウムレベルを上昇させ、PTH を抑制することによって、破骨細胞活性を抑え、骨吸収を抑制すると推察された(Rubinacci 1996)。

以上の結果は、ビタミン C が尿中へのカルシウム排泄を抑制することによってキトサン摂取による骨量減少を軽減する効果を表すことが示唆された。一方、カルシウム補充はキトサンによる血中カルシウムレベルの低下を改善し、骨吸収の抑制により骨量を維持することも示唆された。

現在、キトサンは肥満を予防するダイエット剤として宣伝されている。我々の結果は、キトサンをダイエット補助食品として摂取する際には、カルシウムやビタミン C の摂取を増加するなどして骨量低下を極力抑える対策をとる必要のあることが示唆された。

第 5 章 総合的考察

キトサンは血中コレステロール低下作用や脂質吸収抑制作用を示すことが報告されているが、一方ではカルシウムの腸管吸収を阻害するため骨量減少を招く危険性が指摘されている。しかし、キトサンを長期摂取した場合の骨量に対する影響について検討した報告は数少なく、骨量が急速に低下する閉経後に対するキトサン摂取の影響についての検討例はほとんどない。本論文では、閉経後女性のモデルとして加齢に伴い自然発生的に骨密度の低下を引き起こす SHRSP ラットに卵巣摘出手術を施して、1)キトサンの長期摂取がコレステロール無添加飼料を摂取した卵巣摘出閉経後骨粗鬆症モデルラットの血中コレステロール低下作用及び肥満抑制効果の確認、骨量に対する影響、2)キトサン摂取が引き起こす骨量低下機構の解明、3)キトサン摂取による骨量低下に対するビタミン C 及びカルシウム添加時の予防効果を検討した。その結果、キトサン摂取は卵巣摘出ラットにおいて血清総コレステロール低下作用と体脂肪の蓄積を抑制する一方、骨密度と骨強度を減少させ、骨粗鬆症の進行を助長する可能性を新しく見出した (楊 2001)。またキトサン摂取による骨量減少はカルシウムの腸内吸収がキトサンにより阻害されるのではなく、尿中へのカルシウム排泄を促進することにより血中カルシウムが低下して、PTH の分泌が高まり、その結果骨吸収が促がされることが明らかにされた。そしてビタミン C またはカルシウムの添加はカルシウムの体内保留量を増加させることによって骨量減少を予防することが示された (Yang 2002)。

まず、はじめに卵巣摘出ラットにキトサンを投与することにより、血中コレステロール、腹腔内脂肪重量、骨量への影響を検討した。キトサン摂取によって腹腔内脂肪重量が有意に低下し、血清中総コレステロール濃度も有意に減少した。さらに、大腿骨骨密度及び骨強度、骨灰分量も有意に低下させ、卵巣摘出による骨量減少を著しく悪化させた。本研究の飼料中にはコレステロールも胆汁酸も添加していないので、キトサン摂取による血清総コレステロールの低下は内因性コレステロール代謝の変動を介して発現されたものと推測された。その作用機構としては、胆汁酸の排泄増加や胆汁酸合成の促進 (Sugano 1980)、短

鎖脂肪酸の脂質代謝への影響 (早川 1999)が考えられるが、現在のところその機序を特定することはできなかった。次いで、キトサン摂取が引き起こす骨量低下機構を骨代謝マーカー、カルシウム調節ホルモン、カルシウムとリンの出納、十二指腸の VDR 及び CaBP D9K mRNA の発現などから検討した。さらに、最近になって、大腸において食物繊維が腸内細菌の発酵を受けて生成する有機酸がカルシウムの腸内吸収に強い関与を示す (Demigne 1989, Levrat 1991, Coudray 1997)ことから、有機酸の質・量を考慮に入れた検討も加えた。その結果、カルシウムの腸管吸収についてキトサン摂取群と対照群の差が見られなかったのに対し、キトサン摂取はリンの腸管吸収を有意に減少させた。また、骨量が減少したキトサン摂取群では、尿中カルシウム排泄の増加と血中カルシウム値の低下が見られ、PTH 及び $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が有意に増加した。それに伴って、キトサン群の十二指腸 CaBP D9K と VDR mRNA レベルも有意に増加した。一方、キトサン摂取群の盲腸内酢酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸が増加したが、盲腸内 pH が低下しなかったことから、カルシウムの盲腸内吸収が促進されないことが示された。これらの結果を総合して考えると、キトサン摂取による骨量減少はカルシウムの腸管吸収が阻害されるより、尿中へのカルシウム排泄が促進されたことに起因して、血中カルシウムレベルが低下し、PTH が高まって、骨吸収が亢進したことに基づいて起こることが推察された。また、リンの出納結果から、キトサン摂取による尿中カルシウム排泄の増加はリンの腸内吸収が阻害されることを介して発現する可能性も示唆された。また、カルシウムの能動輸送に不可欠の CaBP D9K と VDR mRNA がキトサン摂取によって増加した結果、カルシウムの腸内吸収に影響を及ぼさなくなった。一方、キトサン摂取が盲腸内カルシウム吸収に効果を示さなかったが、短鎖脂肪酸の一種であるプロピオン酸が増加したことから、キトサン摂取で認められた血中コレステロール低下作用がプロピオン酸によるコレステロール生合成抑制への関与が考えられる。プロピオン酸が HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase (Chen 1984), acetyl-CoA synthetase (西村 1995) を阻害し、肝臓においてコレステロール生合成を抑制すると報告されており、コレス

テロール無添加飼料下でキトサン摂取による血中コレステロール低下作用についてのさらなる研究が必要であると思われた。

キトサンの効果を最大限に活用するためには、他の骨量減少抑制効果を持つ食物因子と組み合わせることが考えられる。骨量低下の予防にはカルシウムの補充効果がよく知られている。一方、ビタミン C をサプリメントとして摂取する閉経後女性の骨量が摂取しない女性より高いという疫学調査の結果(Morton 2001)から、ビタミン C 及びカルシウム添加がキトサン摂取による骨量減少を軽減できるか否かを検討した。その結果、ビタミン C は尿中へのカルシウム排泄を抑制することによってキトサン摂取による骨量減少を軽減し、カルシウム補充はキトサンによる血中カルシウムレベルの低下を改善し、骨吸収の抑制により骨量を維持することが示唆された。

現在、キトサンは肥満防止やコレステロール上昇抑制に有効な食品素材として注目を集め、特定保健用食品の素材として実際にビスケット、即席粥、即席麺などいろいろな食品に添加されて、広く利用されている。我々の結果から、キトサンの長期摂取は血清総コレステロールの低下や体脂肪蓄積の抑制作用が認められたが、閉経後急激に引き起こる骨量減少をさらに悪化させることが明らかになった。閉経後女性や高齢者がキトサンを摂取する際には、ビタミン C やカルシウムの量を増やすなど十分配慮しなければならないことが示唆された。

参考文献

Bagheri S, Gueguen L (1985) Effect of wheat bran and pectin on the absorption and retention of phosphorus, calcium, magnesium and zinc by the growing pig. *Reprod Nutr Dev* **25**: 705-716.

Bourne GH (1972) Vitamin C and bone. *In: The Biochemistry and Physiology of Bone*. Vol. 2 Physiology and Pathology (Bourne GH eds), p231-279, Academic Press, New York.

Boxter J, Shimizu F, Takiguchi Y, Wada M, Yamaguchi T (2000) Effect of iron () chitosan intake on the reduction of serum phosphorus in rats. *Pharm Pharmacol* **52**: 863-874.

Bronner F, Pansu D, Stein WD (1986) An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol* **250**: G561-569.

Cassidy MM, Lightfoot FG, Grau LE (1981) Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon ; a scanning electron microscopy study. *Am J Clin Nutr* **34** : 218-228.

Chen WJL, Anderson JW and Jennings D (1984) Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Bio Med* **175**: 215-218.

Chevalley T, Rizzoli R, Nydegger V (1994) Effects of calcium supplements on femoral bone mineral density and vertebral fracture rate in vitamin-D-replete elderly patients. *Osteoporos Int* **4**: 245-252.

Colin EM, Van Den Bemd GJ, Van Aken M, Christakos S, De Jonge HR, Deluca HF, Prahm JM, Birkenhager JC, Buijman CJ, Pols HA, Van Leeuwen JP (1999) Evidence for involvement of 17beta-estradiol in intestinal calcium absorption independent of 1,25-dihydroxyvitamin D3 level in the rat. *J Bone Miner Res* **14**: 57-64.

Coudray C, Bellanger J, Castiglia-Delavaud C, Remesy C, Vermorel M, Rayssiguier Y (1997) Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur J Clin Nutr* **51**: 375-380.

Cummings JH (1978) Nutritional implication of dietary fiber. *Am J Clin Nutr* **31** : 521-529.

Demigne C, Levrat AM, Remesy C (1989) Effect of feeding fermentable carbohydrate on cecal concentration of minerals and their fluxes between the cecum and blood plasma in the rat. *J Nutr* **119**: 1625-1630.

Deuchi K, Kanauchi O, Imasato Y, Kobayashi E (1994) Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed a high-fat diet. *Biosci Biotech Biochem* **58**:1613-1616.

Deuchi K, Kanauchi O, Shizukuishi M, Kobayashi E (1995) Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. *Biosci Biotech Biochem* **59**: 1211-1216.

Ebihara K, Miyada T, Nakajima A (1993) Hypocholesterolemic effect of cecally infused propionic acid in rats fed a cholesterol-free, casein diet. *Nutr Res* **13**: 209-217.

Ebihara K., Masayasu T (1994) Hypocholesterolemic effect of corn bran hemicellulose in ovariectomized rats fed a cholesterol-free, casein protein diet. *J Jpa Soc Nutr Food Sci* **47**: 407-409.

Engelhardt, Wv (1995) Absorption of short-chain fatty acid from the large intestine. *In*: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acid (Cummings JH, Rombear JL, Sakata T, eds), p149-170. Cambridge University Press, Cambridge.

Erben RG, Weiser H, Sinowatz F, Rambeck WA, Zucker H (1992) Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcify tissue Int* **50**: 228-236.

Franceschi RT (1992) The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Rev* **50**:65-70.

Fukada Y, Kimura K, Ayaki Y (1991) Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipid* **26** : 395-399.

Furda I (1983) Aminopolysaccharides- their potential as dietary fiber: Unconventional Sources of Dietary Fiber. *Amer Chem Soc Symp* **214**: 105-122.

Gordon DT, Williford CB (1983) Chitin and Chitosan: Influence on element absorption in rats. *In*: Unconventional Sources of Dietary Fiber (Gordon DT, Williford CB, eds), p155-185. American Chemical Society.

Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM (1978) Menopause and coronary heart

disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* **89**:157-61.

Gunnes M, Lehmann EH (1995) Dietary calcium, saturated fat, fiber and vitamin C as predictors of forearm cortical and trabecular bone mineral density in healthy children and adolescents. *Acta Paediatr* **84**: 388-392.

Heaney RP (1994) The bone-remodeling transient: implications for the interpretation of clinical studies of bone mass change. *J Bone Miner Res* **9**: 1515-1523.

Henry HL, Norman AW (1984) Vitamin D: metabolism and biological action. *Annu Rev Nutr* **4**: 493-520.

Hoshi S, Sakata T, Mikuni K, Hashimoto H, Kimura S (1994) Galactosylsucrose and xylosylfructoside alter digestive size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid. *J Nutr* **124**: 52-60.

Hungerford DM, Linder MC (1983) Interactions of pH and ascorbate in intestinal iron absorption. *J Nutr* **113**: 2615-2622.

Illman RJ, Topping DL, Dowling K, Trimble RP, Russell GR, Storer GB (1991) Effects of solvent extraction on the hypocholesterolaemic action of oat bran in the rat. *Br J Nutr* **65**: 435-443.

Jennings CD, Boleyn K, Bridges SR, Wood PJ, Anderson JW (1988) A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan, and oat gum in rats.

Proc Soc Exp Biol Med **189**: 13-20.

Kanauchi O, Deuchi K, Imasato Y, Shizukuishi M, Kobayashi E (1995) Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. *Biosci Biotech biochem* **59**: 786-790.

Kato H, Taguchii T, Okuda H, Kondo M, Takara M (1994) Antihypertensive effect of chitosan in rats and humans. *J Traditional Medicine* **11**: 198-205.

LeHoux JG, Grondin F (1993) Some effects of chitosan on liver function in the rats. *Endocrinology* **132**: 1078-1087.

Lee WTK, Leung SSF, Leung DMY, Cheng JCY (1996) A follow-up study on the effects of calcium-supplement withdrawal and puberty of bone acquisition of children. *Am J Clin Nutr* **64**: 71-77.

Levrat AM, Remesy C, Demigne C (1991) High propionic acid fermentation and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. *J Nutr* **121**: 1730-1737.

Mabuchi H, Sakai Y, Watanabe A, Haba T, Koizumi J, Takeda R (1985) Normalization of low-density lipoprotein levels and disappearance of xanthomas during pregnancy in a woman with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* **34**:309-15.

Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T, Takekawa W, Terada A, Hara H, Mitsulka T (1993) Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotech Biochem* **57**: 1439-1444.

Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Cagguila AW, Wing RR (1989) Menopause and risk factor for coronary heart disease. *N Engl J Med* **321**: 641-646.

Mckane WR, Khosla S, Egan KS, Robins SP, Burritt MF, Riggs BL (1996) Role of calcium intake in modulating age-related increases in parathyroid function and bone resorption. *J Clin Endocrinol Metabolism* **81**: 1699-1703.

Miller DD (1989) Calcium in the diet: Food sources, recommended intakes and nutritional bioavailability. *Adv Food Nutr Res* **33**: 103-156.

Muzzarelli RAAA (1977) Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. *In*: Chitin (Muzzarelli RAA, eds), p 5-17. Pergamon Press, New York.

Nordin BEC, Horsman A, Aaron J (1976) Diagnostic procedures. *In* calcium, phosphate and magnesium metabolism (Nordin BEC, eds), p469-524. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Oku T, Konishi F, Hosoya N (1982) Mechanism of inhibitory effect of unavailable carbohydrate on intestinal calcium absorption. *J Nutr* **112**: 410-415.

Omori M, Suzuki Y, Tsugita T, Muraoka T, Hirahara H, Shinkoui S, Sakamoto K (1999) Hypocholesterolemic effect of chitosan added rice gruel using a placebo-controlled double-blind method. *J Jpn Assoc Dietary Fiber Res* **3**: 21-24 (in Japanese).

Pike JW (1991) Vitamin D₃ receptors: structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr* **11**: 189-216.

Pointllart A, Denis I, Colin C, Lacroix H (1997) Vitamin C supplementation does not modify bone mineral content or mineral absorption in growing pigs. *J Nutr* **127**: 1514-1518.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC (1993) AIN-93M purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**: 1939-1951.

Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SD (1993) Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. *N Engl J Med* **328**: 460-464.

Remesy C, Behr SR, Levrat MA, Demigne C (1992) Fiber fermentation in the cecum and its physiological consequences. *Nutr Res* **12**: 1235-1244.

Riggs BL (1991) Overview of osteoporosis. *West J Med Jan* **154**:63-77.

Rubinacci A, Divieti P, Polo RM, Zampino M, Resimini G, Tenni R (1996) Effect of an oral calcium load on urinary markers of collagen breakdown. *J Endocrinol Invest* **19**: 719-726.

Saeki S, Kiriya S (1988) Conservation of hyper- and hypo-cholesterolemic activities of dietary casein and soybean protein isolate after the administration of cholestyramine in the rats. *Nutr Rep Int* **37**: 565-573.

Sawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, Sadowski L, Sahyoun N, Tannenbaum S (1990) A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N Engl J Med* **323**: 878-883.

Slavin JL, Marlett JA (1980) Influence of refined cellulose on human bowel function and calcium and magnesium balance. *Am J Clin Nutr* **31**: 1932-1939.

Slemenda CW, Peacock M, Hui S, Zhou L, Johnston CC (1997) Reduced rates of skeletal remodeling are associated with increased peak bone mineral density during the development of peak skeletal mass. *J Bone Miner Res* **12**: 676-682.

Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Nakashima K, Fukuda N, Hasegawa Y (1980) A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* **33**: 787-793.

Terada A, Hara H, Sato D, Higashi T, Nakayama S, Tsuji K, Sakamoto K, Ishioka E, Maezaki Y, Tsugita T, Takekawa T, Mituoka T (1995) Effect of dietary chitosan on faecal microbiota and faecal metabolites of humans. *Microbial Ecology in Health and disease* **8**: 15-21.

Toba Y, Takada Y, Matsuoka Y, Morita Y, Motouri M, Hirai T, Suguri T, Aoe S, Kawakami H, Kumegawa M, Takeuchi A, Itabashi A (2001) Milk basic protein promotes bone formation and

suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 1353-1357.

Tsuchita H, Suzuki T, Kuwata T. (2001) The effect of casein phosphopeptides on calcium absorption from calcium-fortified milk in growing rats. *Br J Nutr* **85**: 5-10.

Tsuchiya H, Bates CJ (1994) Ascorbic acid deficiency in guinea pigs: contrasting effects of tissue ascorbic depletion and of associated inanition on status indices related to collagen and vitamin D. *Br J Nutr* **72**: 745-752.

Tsunenari T, Fukase M, Fujita T (1991) Bone histomorphometric analysis for the cause of osteopenia in vitamin C-deficient rat (ODA rat). *Calcif Tissue Int* **48**: 18-27.

Umesaki Y, Yajima T, Yokokura T, Matai M (1979) Effect of organic acid absorption on bicarbonate transport in rat colon. *Pflugers Arch* **379**: 43-47.

Wada M, Nishimura Y, Watanabe Y, Takita T, Innami S (1997) Accelerating effect of chitosan intake on urinary calcium excretion by rats. *Biosci biotech Biochem* **61**:1206-1208.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM (1991) Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* **325**: 1196-204.

Weiser H, Schlachter M, Probst HP, Kormann AW (1992) The relevance of ascorbic acid for bone metabolism. *In: Ascorbic Acid in Domestic Animals. Proc. 2nd Symp. Kartause Ittingen,*

Switzerland(Wenk C, Fenster R, Volker L eds), p73-95. ETH. Zurich. Switzerland.

Yamori Y, Fukuda S, Tsuchikura S, Ikeda K, Nara Y, Hbrie R (1991) Stroke-prone SHR (SHRSP) as a model for osteoporosis. *Clin and Exper Hyper* **13**: 755-762.

Yang CY, Oh TW, Nakajima D, Maeda A, Naka T, Kim CS, Igawa SJ, Ohta F (2002) Effects of Habitual Chitosan Intake on Bone Mass, Bone Related Metabolic Markers and Duodenum CaBP D9K mRNA in Ovariectomized SHRSP Rats. *J Nutr. Sci. Vitaminol* **48**: (in press).

葛谷文男(1978) 動脈硬化とコレステロール, 医学書院.

桑野和民, 酒巻千波, 三田村敏男, 吉田 勉 (1987) ラットにおける飼料中タンパク質およびミネラルの利用性に対するオキアミキチンの影響. 日本栄養・食糧学会誌 40:213-219.

吾郷明夫, 権田辰夫, 川上浩平, 武智真由美, 坂本 巖, 小村洋司 (1996) 高血圧自然発症ラットの血圧、血漿脂質に及ぼすキトサン投与の影響. 実験動物技術 312: 105-114.

西村直道, 桐山修八 (1995) ラットにおけるネオマイシン、ストレプトマイシンもしくはペニシリン G 添加食摂取時のビート食物繊維による血漿コレステロール低下作用の変化. 日本栄養・食糧学会誌 48: 459-467.

千勝典子, 松本俊夫 (1999) カルシウム代謝とその調節 カルシウムその基礎、臨床、栄養. (白木正孝、江澤郁子、広田孝子編), p61-67, 財団法人全国牛乳普及協会.

早川享志, 柘植治人(1999) デンプンの摂取と健康 - 難消化性デンプンの生理機能. 日本食物繊維研究会誌 3: 55-64.

塚原典子、江澤郁子 (2001) 骨粗鬆症の予防と栄養 栄養と運動 - 予防の視点から. 臨床栄養 99: 284-289.

武田秀敏, 桐山修八 (1995) 食物繊維の物理化学的性質. 改訂新版食物繊維. (印南 敏, 桐山修八編集), p59-79, 第一出版.

木村修一, 家森幸男編集 (1994) 疾患モデル動物. p142-144. 建帛社.

楊筑雅, 中嶋大渡, 吳泰雄, 金昌宣, 太田富貴雄 (2001) 卵巣摘出ラットの骨量と血清総コレステロールに対するキトサン長期摂取の影響. ヒューマンサイエンスリサーチ 10: 265-274.

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始御指導を賜りました早稲田大学人間科学部太田富貴雄教授に心から御礼を申し上げます。また骨密度測定に関して御指導いただきました日本体育大学健康管理研究室井川正治教授に深謝いたします。併せて、実験、論文作成に関して貴重なご協力、ご助言をいただきました早稲田大学人間科学部栄養研究室の金昌宣さん、中嶋大渡さん、呉泰雄さん、前田敦子さん、宮崎 純さんに深く感謝いたします。