

美容・健康機能性素材の高度化に関する研究

－プロテオグリカンへのカリウムとナトリウムの付加－

Research on advance of the beauty and healthy functionality material

- Addition of potassium or sodium to proteoglycan -

山口 信哉

青森県産の機能性素材であるプロテオグリカン（PG）は、現在、多数の化粧品や食品に使われている。化粧品に使われている理由としては、ヒアルロン酸と同等以上の保水性を有するのにサラサラしてべとつかないことや、上皮細胞増殖因子様作用を有することなどがあげられる。

当部ではPGの機能性向上に取り組み、化学的な処理を施すことにより、いくつかの新規PGを開発した。そのうちのカリウム(K)やナトリウム(Na)イオンを付加したPGは、保水能が従来のPGの約2.7倍向上し、アレルギー抑制などの機能性も向上することが明らかにされている。プロテオグリカンと各種カリウム塩やナトリウム塩との接触によるこれら金属イオンの挙動を調べたところ、半透膜を介してPGと塩化物塩が接触すると、PG中のカリウムの含量が9%以上、またナトリウムの含量が7%以上になることがわかった。カリウム型PGやナトリウム型PGを、従来の陽イオン交換樹脂の使用以外の方法で、新たに調製できるようになった。

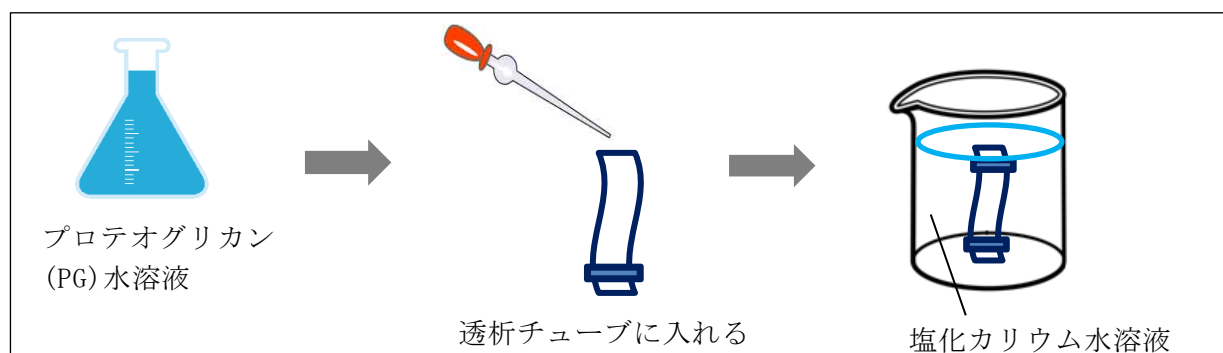


図 1 カリウム型 PG の調製法

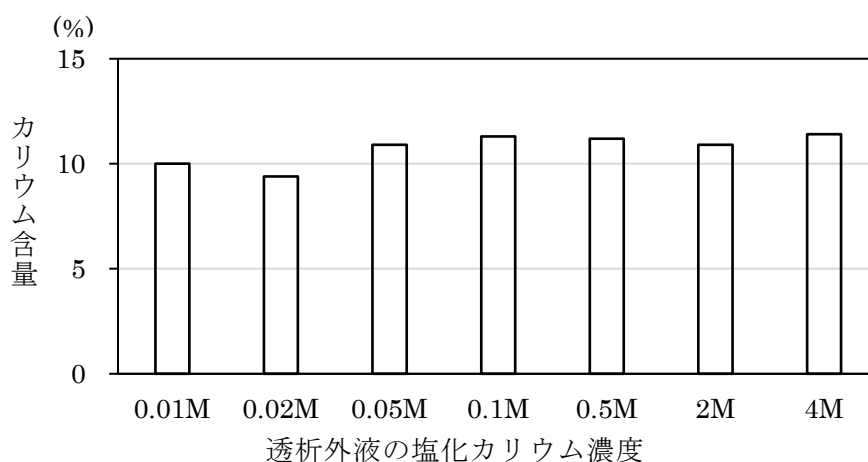


図 2 透析処理した PG 中のカリウム含量

1. はじめに

プロテオグリカンは高い保水性や上皮細胞増殖因子様作用を有している。そのため多くの化粧料の成分として用いられている。その他、動物実験でアレルギー抑制効果や抗肥満効果を示すことが知られている。プロテオグリカンにカリウムやナトリウムを付加させたプロテオグリカンは、保水性やアレルギー抑制効果が向上することが明らかになっている^{1, 2)}。鮭鼻軟骨から酢酸により抽出されたプロテオグリカンは金属としてカルシウムを多く含んでおり、カリウムやナトリウムの付加の多くはカルシウムの置換である。カリウムやナトリウムの置換は強酸性陽イオン交換樹脂により行われ³⁾、カリウムは最大 12%、ナトリウムは最大 9.3%付加されるが、プロテオグリカンの処理量は樹脂の量に制限される欠点があった。本研究では、プロテオグリカンのカリウムやナトリウムに対する基本的な挙動を明らかにし、イオン交換樹脂法以外の付加方法について検討した。

2. 実験方法

2-1. プロテオグリカン中のカリウムとナトリウム、カルシウムの分析方法

プロテオグリカンは、市販の鮭由来プロテオグリカン（角弘プロテオグリカン研究所）を購入し、用いた。

プロテオグリカン中のカリウムとナトリウム、カルシウム量を、キャピラリー電気泳動装置（Agilent7100 キャピラリー電気泳動システム、アジレント・テクノロジー（株）製）を用いて定量した。各金属の定量法については、UV吸収を有する緩衝液で満たしたキャピラリーカラムに、試料を注入して電圧をかけることで、試料中の各金属イオンを分離しながら移動させ、UV検出部を通過する時のUV吸収の減少分により検出する間接吸光法を採用した。カラムにフェーズドシリカキャピラリー（内径 50 μm 、有効長 56cm、アジレント・テクノロジー（株）製）、緩衝液に陽イオン分析バッファ（PartNo. 5064-8203、アジレント・テクノロジー（株）製）を用い、検出UV波長 310nm、泳動温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、電圧 30kV で泳動した。試料注入条件は 50mber、4秒で行った。カリウム、ナトリウム、カルシウムの濃度は、あらかじめそれぞれの検量線を作成し求めた。カリウム、ナトリウム、カルシウムは、塩化カリウム（特級、和光純薬工業（株））、塩化ナトリウム（特級、和光純薬工業（株））、塩化カルシウム（特級、和光純薬工業（株））を用い、内部標準として 2ppm 濃度で加えたマグネシウム（塩化マグネシウム、特級、和光純薬工業（株））とピーク面積の比で作成した。プロテオグリカン中のカリウム、ナトリウム、カルシウム量を測定する際、内部標準として 2ppm のマグネシウム（塩化マグネシウム）を添加し、300ppm に調製し、電気泳動に供した。カリウム、ナトリウム、カルシウムの検量線の下限濃度はそれぞれ 5ppm、2.5ppm、2ppm だったため、300ppm のプロテオグリカンに含まれるカリウム、ナトリウム、カルシウムは 1.7%、0.8%、0.7%が下限濃度であった。

2-2. プロテオグリカンと塩化カリウムの接触

市販のプロテオグリカン 10mg を所定濃度の塩化カリウム溶液 2mL に溶解し、25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間放置した。塩化カリウムの濃度は、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、1M、2M、3M、4M である。その後、過剰の塩化カリウムを除去するため、この溶液を透析用セルロースチューブ（外周 5cm×長さ 8cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じ、500mL の脱イオン水を入れたビーカーに浮かせ、4 $^{\circ}\text{C}$ の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日

に3回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのカリウム量とカルシウム量を測定した。

2-3. プロテオグリカンと各種カリウム塩の接触

市販のプロテオグリカン 10mg を下記のカリウムを含む塩溶液 2mL に溶解し、25°C で 1 時間放置した。0.1M 酢酸カリウム、0.1M 酢酸カリウム緩衝液 (pH4.0)、0.1M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.5)、0.1M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.2)、0.1M クエン酸カリウム緩衝液 (pH3.2)、0.1M クエン酸カリウム緩衝液 (pH2.9)、0.1M リン酸二水素カリウム。

また、0.2M 塩化カリウムを下記の緩衝液や酢酸に溶解し、これらの溶液に市販のプロテオグリカン 10mg を溶解し、25°C で 1 時間放置した。0.05M 酢酸カリウム緩衝液 (pH4.0)、0.05M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.5)、0.05M クエン酸カリウム緩衝液 (pH3.2)、0.05M クエン酸カリウム緩衝液 (pH2.9)、1%酢酸。

次に、過剰の塩を除去するため、これらのプロテオグリカンを含む溶液を透析用セルロースチューブ (外周 5cm×長さ 8cm、エーディア (株)) に入れ、上下の口を封じ、500mL の脱イオン水を入れたビーカーに浮かせ、4°C の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日に 3 回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのカリウム量とカルシウム量を測定した。

2-4. プロテオグリカンと塩化ナトリウムの接触

プロテオグリカン 10mg を所定濃度の塩化ナトリウム溶液 2mL に溶解し、25°C で 1 時間放置した。塩化ナトリウムの濃度は、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、1M、2M、3M、4M である。その後、過剰の塩化ナトリウムを除去するため、この溶液を透析用セルロースチューブ (外周 5cm×長さ 8cm、エーディア (株)) に入れ、上下の口を封じ、500mL の脱イオン水を入れたビーカーに浮かせ、4°C の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日に 3 回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのナトリウム量とカルシウム量を測定した。

2-5. 半透膜を介したプロテオグリカンと塩化カリウムの接触

プロテオグリカン 10mg を蒸留水 2mL に溶解し、半透膜である透析用セルロースチューブ (外周 5cm×長さ 8cm、エーディア (株)) に入れ、上下の口を封じた。200mL のビーカーに所定濃度の塩化カリウム水溶液 200mL を入れて、プロテオグリカンが入っているセルロースチューブを塩化カリウム水溶液中に浮遊させ、ビーカーに攪拌子を入れてスターラーで攪拌した。外液の塩化カリウムの濃度は、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.5M、2M、4M である。ビーカーは 4°C の低温室に放置した。

6 時間後、プロテオグリカンが入っている各セルロースチューブを、200mL の脱イオン水を入れたビーカーに移し、4°C の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日に 3 回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのカリウム量とカルシウム量を測定した。

2-6. 半透膜を介したプロテオグリカンと各種カリウム塩の接触

プロテオグリカン 10mg を蒸留水 2mL に溶解し、半透膜である透析用セルロースチューブ（外周 5cm×長さ 8cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じた。200mL のビーカーに 0.05M 硫酸カリウム、0.05M 硝酸カリウム、0.05M リン酸水素二カリウム、0.05M 酢酸カリウム 200mL 入れて、プロテオグリカンが入っているセルロースチューブをカリウム塩水溶液中に浮遊させ、ビーカーに攪拌子を入れてスターラーで攪拌した。ビーカーは 4℃の低温室に放置した。

6 時間後、プロテオグリカンが入っている各セルロースチューブを、200mL の脱イオン水を入れたビーカーに移し、4℃の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日に 3 回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのカリウム量とカルシウム量を測定した。

2-7. 半透膜を介したプロテオグリカンと塩化ナトリウムの接触

プロテオグリカン 10mg を蒸留水 2mL に溶解し、半透膜である透析用セルロースチューブ（外周 5cm×長さ 8cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じた。200mL のビーカーに所定濃度の塩化ナトリウム水溶液 200mL を入れて、プロテオグリカンが入っているセルロースチューブを塩化ナトリウム水溶液中に浮遊させ、ビーカーに攪拌子を入れてスターラーで攪拌した。外液の塩化ナトリウムの濃度は、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.5M、2M、4M である。ビーカーは 4℃の低温室に放置した。

6 時間後、プロテオグリカンが入っている各セルロースチューブを、200mL の脱イオン水を入れたビーカーに移し、4℃の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日に 3 回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのナトリウム量とカルシウム量を測定した。

2-8. 半透膜を介したプロテオグリカンと各種ナトリウム塩の接触

プロテオグリカン 10mg を蒸留水 2mL に溶解し、半透膜である透析用セルロースチューブ（外周 5cm×長さ 8cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じた。200mL のビーカーに 0.1M 硫酸ナトリウム、0.1M 硝酸ナトリウム、0.1M リン酸水素二ナトリウム、0.1M 酢酸ナトリウム 200mL 入れて、プロテオグリカンが入っているセルロースチューブをナトリウム塩水溶液中に浮遊させ、ビーカーの下に攪拌子を入れてスターラーで攪拌した。ビーカーは 4℃の低温室に放置した。

6 時間後、プロテオグリカンが入っている各半透膜を、200mL の脱イオン水を入れたビーカーに移し、4℃の低温室で 2 日間、水に対し透析した。外液のビーカーの脱イオン水は 1 日に 3 回交換した。セルロースチューブ内液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥で得られたプロテオグリカンのナトリウム量とカルシウム量を測定した。

3. 結果

3-1. プロテオグリカン中のカリウムとナトリウム、カルシウムの分析

キャピラリー電気泳動はイオンを測定でき、プロテオグリカンに含まれている金属もイオンとして測定した。図 1 に検量線作成時に使用した標準試料（カリウム 10ppm、ナトリウム 10ppm、カルシウム 4ppm、マグネシウム 2ppm）のクロマトグラフを示す。

使用した原料のプロテオグリカンの金属含量をキャピラリー電気泳動で測定したところ、カリウムは検出限界以下、ナトリウム含量は0.8%、カルシウム含量は4.5%であった（表1）。

表1 原料プロテオグリカンの金属含量

カリウム含量	- (検出限界以下)
ナトリウム含量	0.8%
カルシウム含量	4.5%

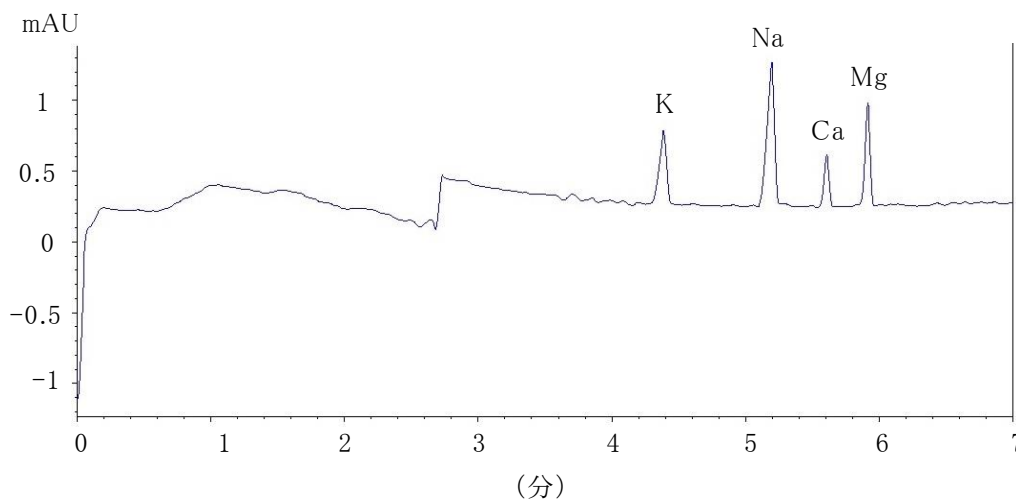


図1 キャピラリー電気泳動クロマトグラフィーによる金属イオンの測定

3-2. プロテオグリカンと塩化カリウムの接触

塩化カリウムの濃度、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、1M、2M、3M、4Mにプロテオグリカン溶解したときのプロテオグリカン中のカリウム含量は、検出限界以下、1.2%、1.8%、1.4%、8.4%、8.7%、9.4%、9.7%、10.4%、10.6%であった。カルシウム含量は3.3%、3.0%、2.6%、2.7%、1.3%、1.1%、1.2%、1.4%、1.2%、0.9%であった。塩化カリウムの濃度が0.2M以上のとき、カリウムの含量が8%以上と急に多くなり、カルシウム含量も2%以下と急に少なくなった（図2）。単に塩化カリウム溶液にプロテオグリカン溶解しただけでカリウムを含むようになるが、カルシウムがまだ0.9%以上残っており、従来のイオン交換樹脂によって調製されるカリウム型プロテオグリ

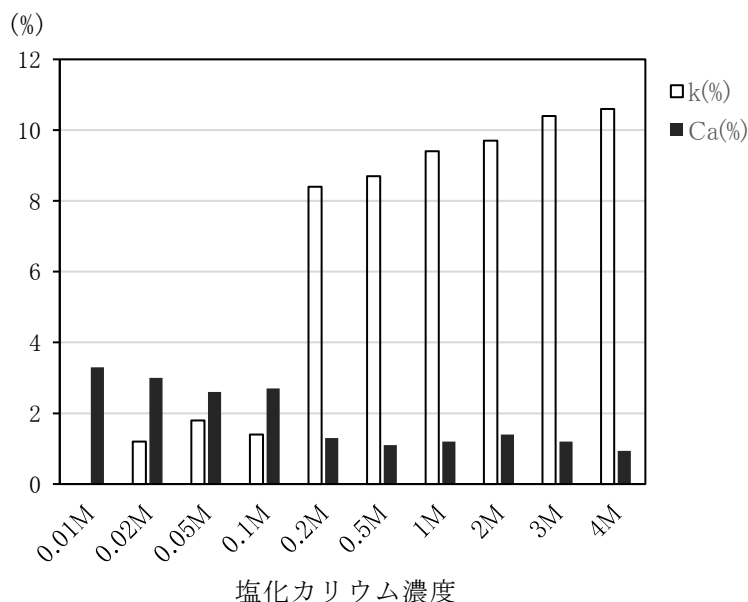


図2 プロテオグリカンと塩化カリウム溶液の接触による金属含量の変化

カンに比較すると保水性などは不十分であると思われる。

3-3. プロテオグリカンと各種カリウム塩の接触

市販のプロテオグリカン塩化カリウム以外の塩溶液に溶解したところ、全ての溶液でカリウムは検出限界以下であり、カルシウム含量は元のプロテオグリカンよりは減少していたが、全て1%以上であった（表2）。

また、さまざまなカリウムを含む緩衝液に0.2M塩化カリウムを加えたときも、全ての溶液でカリウムは検出限界以下であり、カルシウム含量は元のプロテオグリカンよりは減少していたが、全て1%以上であった（表3）。塩化カリウム単独が最も効率的にカリウムを付加でき、カルシウムが少なくなることがわかった。

表2 プロテオグリカンとカリウム塩溶液の接触による金属含量の変化

	カリウム含量 (%)	カルシウム含量 (%)
0.1M 酢酸カリウム	- (検出限界以下)	1.4
0.1M 酢酸カリウム緩衝液 (pH4.0)	- (検出限界以下)	1.7
0.1M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.5)	- (検出限界以下)	1.5
0.1M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.2)	- (検出限界以下)	1.6
0.1M クエン酸カリウム緩衝液 (pH3.2)	- (検出限界以下)	1.6
0.1M クエン酸カリウム緩衝液 (pH2.9)	- (検出限界以下)	2.3
0.1M リン酸二水素カリウム	- (検出限界以下)	1.2

表3 プロテオグリカンと0.2M塩化カリウムを含む各種緩衝液等の接触による金属含量の変化

	カリウム含量 (%)	カルシウム含量 (%)
0.05M 酢酸カリウム緩衝液 (pH4.0)	- (検出限界以下)	1.8
0.05M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.5)	- (検出限界以下)	2.2
0.05M 酢酸カリウム緩衝液 (pH3.2)	- (検出限界以下)	2.0
0.05M クエン酸カリウム緩衝液 (pH2.9)	- (検出限界以下)	1.9
1%酢酸	- (検出限界以下)	1.8

3-4. プロテオグリカンと塩化ナトリウムの接触

塩化ナトリウムの濃度、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、1M、2M、3M、4M にプロテオグリカンを溶解したときのプロテオグリカン中のナトリウム含量は、1.0%、1.2%、2.1%、1.8%、5.6%、5.9%、5.6%、5.7%、5.7%、(%)

5.5%であった。カルシウム含量は3.1%、3.2%、2.6%、2.7%、0.9%、0.8%、0.8%、0.7%、0.8%、0.7%であった。塩化ナトリウムの濃度が0.2M以上のとき、ナトリウムの含量が5%以上と急に多くなり、カルシウム含量は1%以下と急に少なくなった(図3)。単に塩化ナトリウム溶液にプロテオグリカンを溶解しただけでナトリウムが含むようになるが、カルシウムがまだ0.7%以上残っており、従来のイオン交換樹脂によって調製されるナトリウム型プロテオグリカンと比較すると保水性などは不十分であると思われる。

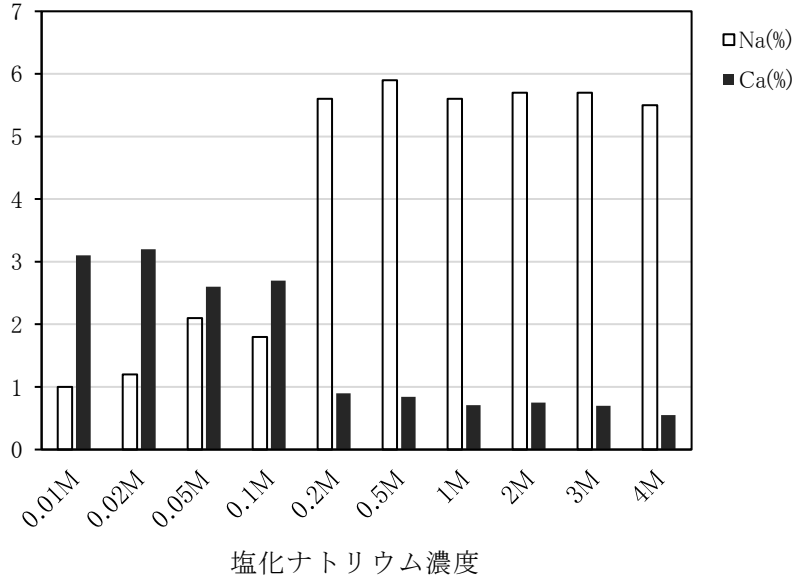


図3 プロテオグリカンと塩化ナトリウム溶液の接触による金属含量の変化

3-5. 半透膜を介したプロテオグリカンと塩化カリウムの接触

プロテオグリカン透析用セルロースチューブに入れ、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.5M、2M、4M濃度の塩化カリウム水溶液に対し透析したところ、それぞれの濃度のカリウム含量は、10.0%、9.4%、10.9%、11.3%、11.2%、10.9%、11.4%であった。カルシウム含量は0.01M塩化カリウムのとき0.9%であり、それ以外は検出限界以下であった(図4)。

プロテオグリカンと塩化カリウムの半透膜を介した接触によりカルシウムがカリウムに置換され、塩化カリウムが0.01Mでもカリウムが約10%付加することがわかった。

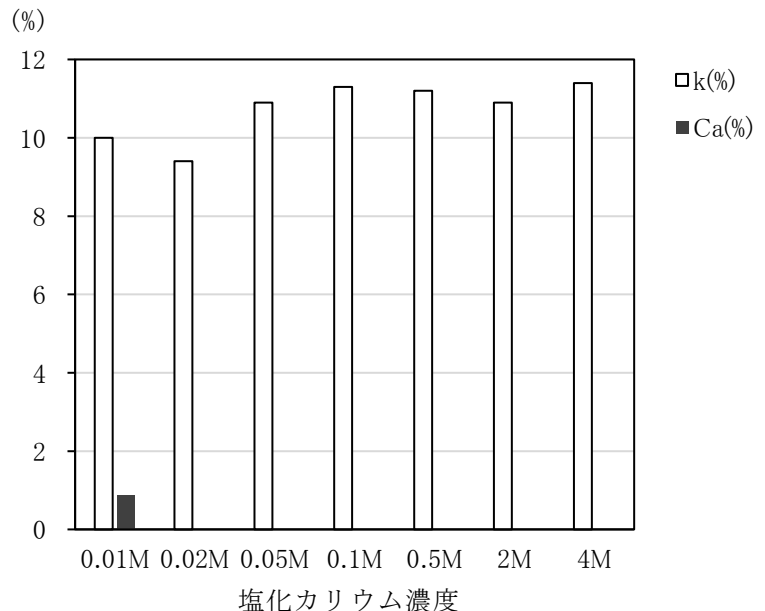


図4 プロテオグリカンと塩化カリウム溶液の半透膜を介した接触による金属含量の変化

3-6. 半透膜を介したプロテオグリカンと各種カリウム塩の接触

プロテオグリカン透析用セルロースチューブに入れ、0.05M 硫酸カリウム、0.05M 硝酸カリウム、0.05M リン酸水素二カリウム、0.05M 酢酸カリウムに対し透析したところ、それぞれのカリウム含量は、5.5%、4.9%、6.2%、6.8%であった。カルシウム含量は、硫酸カリウムと硝酸カリウムは検出限界以下であったが、リン酸水素二カリウムは4.8%、酢酸カリウムは1.2%であった(表4)。

表4 プロテオグリカンと塩化カリウム溶液の半透膜を介した接触による金属含量の変化

	カリウム含量 (%)	カルシウム含量 (%)
0.05M 硫酸カリウム	5.5	- (検出限界以下)
0.05M 硝酸カリウム	4.9	- (検出限界以下)
0.05M リン酸水素二カリウム	6.2	4.8
0.05M 酢酸カリウム	6.8	1.2

塩化カリウムと比較すると、カリウム含量は低く、カルシウム含量は高かった。

3-7. 半透膜を介したプロテオグリカンと塩化ナトリウムの接触

プロテオグリカン透析用セルロースチューブに入れ、0.01M、0.02M、0.05M、0.1M、0.5M、2M、4M濃度の塩化ナトリウム水溶液に対し透析したところ、それぞれの濃度のナトリウム含量は、5.5%、5.7%、7.3%、7.3%、8.6%、9.2%、8.8%であった。カルシウム含量は0.01M塩化ナトリウムのとき1.1%、0.02M塩化ナトリウムのとき1.0%であり、それ以外は検出限界以下であった(図5)。

プロテオグリカンと塩化ナトリウムの半透膜を介した接触によりカルシウムがナトリウムに置換され、塩化ナトリウムが0.05Mでもナトリウムが8%付加することがわかった。

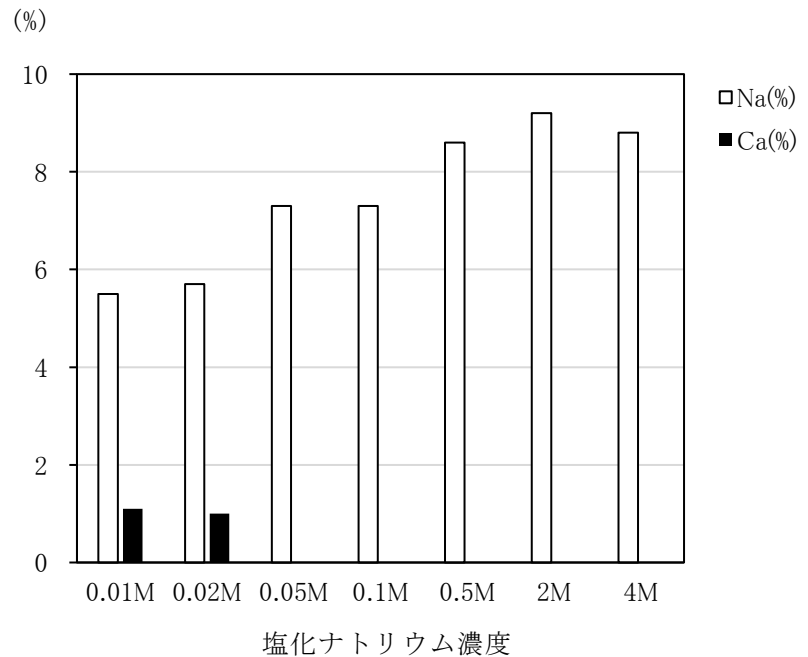


図5 プロテオグリカンと塩化ナトリウム溶液の半透膜を介した接触による金属含量の変化

3-8. 半透膜を介したプロテオグリカンと各種ナトリウム塩の接触

プロテオグリカン透析用セルロースチューブに入れ、0.05M 硫酸ナトリウム、0.05M 硝酸ナトリウム、0.05M リン酸水素二ナトリウム、0.05M 酢酸ナトリウムに対し透析したところ、それぞれのナトリウム含量は、4.3%、4.1%、6.5%、5.6%であった。カルシウム含量は全て検出限界以下で

あった（表 5）。塩化ナトリウムに比較すると、ナトリウム含量は低かった。

表 5 プロテオグリカンと塩化ナトリウム溶液の半透膜を介した接触による金属含量の変化

	ナトリウム含量 (%)	カルシウム含量 (%)
0.05M 硫酸ナトリウム	4.3	- (検出限界以下)
0.05M 硝酸ナトリウム	4.1	- (検出限界以下)
0.05M リン酸水素二ナトリウム	6.5	- (検出限界以下)
0.05M 酢酸ナトリウム	5.6	- (検出限界以下)

4. まとめ

- 1) 市販の鮭由来プロテオグリカンを塩化カリウム溶液に溶解したところ、塩化カリウム 0.2M 以上の濃度で、プロテオグリカンにカリウムが 8%以上付加された。しかし、カルシウムは 0.9%以上残っていた。
- 2) 上記 1) で、塩化カリウム以外のカリウム塩では、カリウムがプロテオグリカンに付加することはなかった。
- 3) 市販の鮭由来プロテオグリカンを塩化ナトリウム溶液に溶解したところ、塩化ナトリウム 0.2M 以上の濃度で、プロテオグリカンにナトリウムが 5%以上付加された。しかし、カルシウムは 0.8%以上残っていた。
- 4) 市販の鮭由来プロテオグリカン、半透膜を介して塩化カリウム溶液に接触させたところ、カリウムが 9%以上付加された。0.02M 以上の塩化カリウム溶液ではプロテオグリカンのカルシウムは検出限界以下であった。
- 5) 上記 4) で、塩化カリウム以外のカリウム塩では、カリウムは付加したが、7%以下であった。
- 6) 市販の鮭由来プロテオグリカン、半透膜を介して塩化ナトリウム溶液に接触させたところ、ナトリウムが 7%以上付加された。0.05M 以上の塩化ナトリウム溶液ではプロテオグリカンのカルシウムは検出限界以下であった。
- 7) 上記 6) で、塩化ナトリウム以外のナトリウム塩ではナトリウムは付加したが、7%以下であった。

5. 参考文献

- 1) 中根 明夫他：公開特許公報、特開 2019-127458 号（令和 1 年 8 月 1 日公開）
- 2) 小野 久弥他：公開特許公報、特開 2017-48150 号（平成 29 年 3 月 9 日公開）
- 3) 安保 亜衣子他：公開特許公報、特開 2016-29150 号（平成 28 年 3 月 3 日公開）