

にがり成分による新規機能性食品開発の基礎的アプローチ

榎本 秀一^{1,2}, 廣村 信², 神野 伸一郎²

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科医薬品機能分析学分野,

²理化学研究所 CMIS・複数分子イメージング研究チーム

概要 近年、国民栄養調査において、マグネシウム、カルシウムや亜鉛をはじめとする各種ミネラルが慢性的摂取不足と言われており、これらミネラルの不足は糖尿病や心疾患等の発症リスクに繋がると危惧されている。製塩の副産物である「にがり」は、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン等の各種ミネラル成分を多く含む「天然」の栄養補助食品として注目されている。報告者らは最近、にがり中に含まれる亜鉛と低分子化合物を錯体化することで、亜鉛イオンが効率良く体内で吸収され、組織に移行することを発見した。そこで本知見より、種々の機能性低分子化合物との錯体化は、にがり成分の吸収効率を向上させ、健康の維持や回復に飛躍的な効果を示す新たな機能性食品開発につながると考えた。そこで本研究では、にがり成分の亜鉛に着目し、低分子化合物との錯体化合物を創製し、糖尿病の機能性食品としての開発を目的とし研究を行った。

2型糖尿病はインスリンの分泌異常や作用欠如、あるいはその両方に起因する高血糖を特徴としている。近年、亜鉛イオン [Zn(II)] がインスリン様作用を持つことが示され、糖尿病治療薬を目的とした血糖降下作用を有する亜鉛錯体が多数開発されている。報告者は、リガンド化合物として、毒性が低く、亜鉛と容易に錯体を形成する dithiosemicarbazone (DTS) 誘導体に着目し、抗糖尿病作用を示す新規亜鉛錯体、Zn-3,4-heptanedione-bis(N4-methylthiosemicarbazonato) (Zn-HTSM) を合成し、その物理化学的性質の解析と2型糖尿病 KK-A^y マウスにおける抗糖尿病作用の検討を行った。

Zn-HTSM、Zn-ATSM 錯体はメチルチオセミカルバジドと各種ジケトン誘導体を酢酸酸性溶液中で還流し、得られた DTS 誘導体をメタノール中で酢酸亜鉛と還流させることで合成した。Zn-HTSM 及び Zn-ATSM 錯体の分配係数(PC 値)を測定したところ、Zn-HTSM は Zn-ATSM より高い脂溶性を持つことが明らかとなった。これは、R¹ 基のアルキル鎖を延長した結果、脂溶性が増加したと考えられる。一方、Zn-HTSM と Zn-ATSM の亜鉛解離定数は、ほぼ同程度であった。続いて、KK-A^y マウスにおいて、Zn-HTSM は単回腹腔内投与、連続経口投与いずれも血糖降下作用が示され、Zn-HTSM の連続経口投与によって耐糖能異常が改善された。これらの作用は、HTSM が ATSM より高い脂溶性を有していたことから、Zn-HTSM は細胞膜を透過することで、脂肪組織内のインスリンシグナル伝達系に作用し、グルコースの細胞内取り込みを増加させたことが示唆された。以上の結果から、Zn-DTS 錯体は2型糖尿病の有効な機能性食品となりうる可能性が示された。

1. 緒言

近年、国民栄養調査において、マグネシウム、カルシウムや亜鉛をはじめとする各種ミネラルが慢性的摂取不足と言われており、これらミネラルの不足は糖尿病や心疾患等の発症リスクに繋がると危惧されている。各種ミネラルは食物からの吸収により補われるが、食の欧米化、医薬品によ

るキレート作用、長期輸液治療等により全身性のミネラル不足に陥っており、栄養補助食品としてのミネラル補給が必要とされる。製塩の副産物である「にがり」は、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン等の各種ミネラル成分を多く含む「天然」の栄養補助食品として注目されている。報告者らは最近、にがり中に含まれる亜鉛と低分子化合

物を錯体化することで、亜鉛イオンが効率良く体内で吸収され、組織に移行することを発見した。そこで本知見より、種々の機能性低分子化合物との錯体化は、にがり成分の吸収効率を向上させ、健康の維持や回復に飛躍的な効果を示す新たな機能性食品開発につながると考えた。そこで本研究では、にがり成分の亜鉛に着目し、低分子化合物との錯体化合物を創製し、糖尿病の機能性食品としての開発を目的として研究を行った。

亜鉛(Zn)は、成人の体内に2-3 g存在し、生物学的機能活性に関与する酵素、たとえば酸化還元酵素 Superoxide dismutase (SOD) など多くのタンパク質の構成成分として必要不可欠な必須微量元素である。また亜鉛は、インスリンの高次構造を形成するために必要なだけでなく、合成、貯蔵や分泌においても重要な役割を果たしている。そのため、膵島細胞における亜鉛の減少はインスリン生産や分泌能力の低下を引き起こし、特に2型糖尿病の発症に強く影響を与えられていると考えられている。実際、2型糖尿病のモデル動物や患者への亜鉛イオン投与で有効な効果を発揮した報告があることから、亜鉛が2型糖尿病の治療に利用できる金属であることがわかっている。しかしながら、亜鉛は生物学的利用能が低く、食事から吸収される亜鉛量はごく微量であるため、亜鉛イオンによる血糖降下作用は高用量、長期間の投与でしか効果を発揮しない。特に、糖尿病患者は亜鉛量の少ない食事を摂取すると末梢組織のグルコース取り込み低下やインスリン利用能の低下により糖尿病症状が悪化する。さらに、糖尿病患者は症状の一つである多飲多尿が原因で亜鉛を排泄しやすく、亜鉛不足に陥りやすいことが報告されている。一方、亜鉛の過剰摂取で吐き気、嘔吐、下痢や発熱などの症状が現れることが知られているため、亜鉛の適切な服用量の管理が必要であると考えられる。

そこで報告者は、亜鉛の錯体化が抗糖尿病作用強化に繋がる生物学的利用能の増加と亜鉛の毒性減少に有効ではないかと考えた。そのため、低分子量で電荷を持たず、適度の脂溶性を持った金属錯体を選択することにした。Dithiosemicarbazone (DTS) 錯体は金属錯体医薬品として従来から研究されている。そこで、本研究室では Zn-DTS 錯体の抗糖尿病作用の可能性を期待し、糖尿病の機能性食品としての開発を目的として本研究に取り組んだ。DTS 誘導体は、上方のアルキル鎖が脂溶性に、環

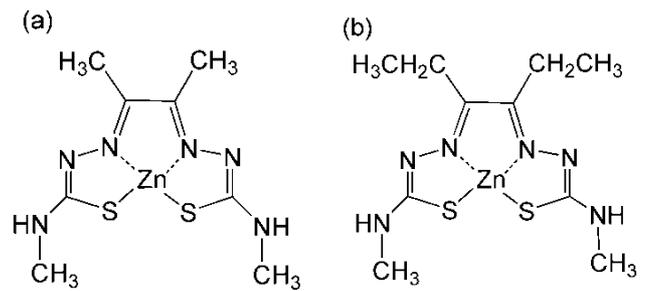


Fig. 1. Structures of (a) Zn-ATSM and (b) Zn-HTSM

外アミノ基と結合する置換基が脂溶性と亜鉛の結合安定性に関係することが知られている。そこで、Zn-ATSM ではメチル基である R^1 をエチル基に置換した Zn-3,4-heptanedione-bis (N4-methylthiosemicarbazonato) [Zn-HTSM, Fig. 1(b)]を合成することにより脂溶性の向上を試みた。この研究では、合成した Zn-DTS 錯体の物理化学的性質の測定と血糖降下作用をはじめとした抗糖尿病作用の評価を行った。¹

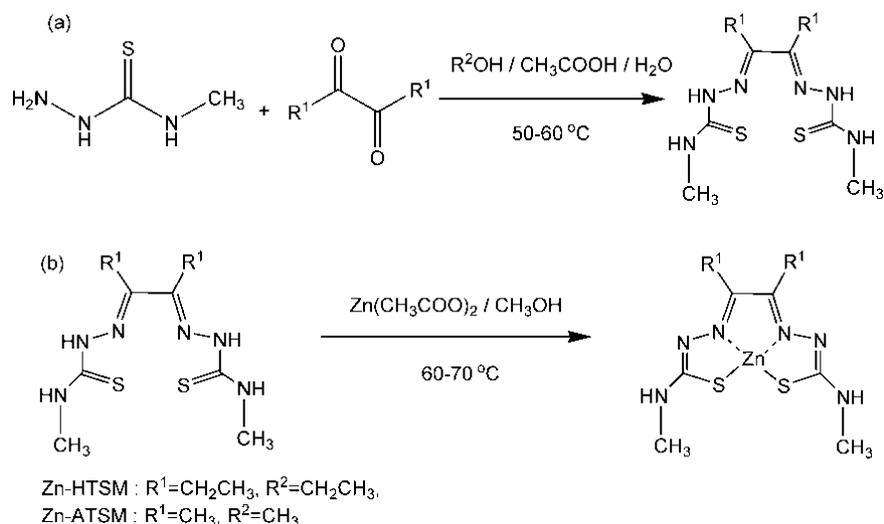
2. 結果

2.1 DTS 誘導体と Zn-DTS 錯体の合成

メチルチオセミカルバジドと相対するジケトン誘導体を酢酸酸性溶液中で還流した後、アセトニトリルにより再結晶し、DTS 誘導体である白色の粉末の HTSM または ATSM を得た。続いて、得られた DTS 誘導体をメタノール中で酢酸亜鉛と還流後、メタノールとジエチルエーテルで洗浄後乾燥し、黄色粉末の Zn-HTSM、Zn-ATSM を得た。いずれの化合物も簡便に合成することができた (Scheme 1)。精製後、減圧乾燥した化合物を NMR、元素分析、MS を用いて化合物の同定を行った。その結果、Zn-HTSM、Zn-ATSM どちらの錯体も目的の錯体を合成することができたことが示された。

2.2 DTS 誘導体の脂溶性と亜鉛との結合安定性

Zn-HTSM、Zn-ATSM 及びそれぞれの配位子である DTS 誘導体の Tris-HCl 緩衝溶液中 (pH=7.4) での紫外可視吸収スペクトルを測定した結果、DTS 誘導体は 400 nm 以上にほとんど吸収を示さなかった。一方、亜鉛の添加により、350 - 500 nm において錯体に帰属される吸収スペクトルが現れた。その時の Zn-HTSM の極大吸収波長 (λ_{max}) は 420 nm、Zn-ATSM は 405 nm であり、 λ_{max} におけるそれ



Scheme 1. Synthetic routes of (a) DTS derivatives and (b) Zn-DTS complexes

Table 1. Photophysical properties of Zn-ATSM and Zn-HTSM

Compounds	Elemental Analysis Found (Calcd.)			HR-MS (EI) Found (Calcd.)	λ_{\max} (nm) and ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)		Log PC	-Log K _d
	C (%)	H (%)	N (%)		Tris buffer	n-octanol		
Zn-HTSM	34.25 (34.14)	4.68 (5.16)	23.93 (23.89)	350.0323 (350.0326)	420 (1.00 × 10 ⁴)	440 (1.00 × 10 ⁴)	n.d.	5.81
Zn-ATSM	29.87 (29.68)	4.20 (4.36)	25.95 (25.96)	322.0010 (322.0013)	405 (1.02 × 10 ⁴)	430 (1.07 × 10 ⁴)	1.18	5.84

n.d. = not detected.

それぞれのモル吸光係数 (ϵ) は、Zn-HTSM は 1.00×10^4 cm⁻¹ M⁻¹、Zn-ATSM は 1.02×10^4 cm⁻¹ M⁻¹ であった。続いて、*n*-octanol 中における ϵ を同様に測定したところ、Zn-HTSM は 1.00×10^4 cm⁻¹ M⁻¹ (λ_{\max} = 440 nm)、Zn-ATSM は 1.07×10^4 cm⁻¹ M⁻¹ (λ_{\max} = 430 nm) であった。

続いて、Zn-HTSM 及び Zn-ATSM の *n*-octanol/Tris-HCl 緩衝溶液での分配係数 (PC 値) を調べたところ、Zn-ATSM の Log PC 値が 1.18 であったのに対し、Zn-HTSM は全量が *n*-octanol 層に移行したため、Log PC 値を算出することができなかった。また HTSM の亜鉛との解離定数 (K_d) は、ATSM の K_d 値とほぼ変わらず、ATSM と同程度の亜鉛との結合安定性を持つことが明らかとなった。(Table 1)

2. 3 Zn-HTSM の単回腹腔内投与による血糖降下作用

亜鉛錯体の血糖降下作用を評価するため、KK-A^y マウスに単回腹腔内投与を行った。腹腔内投与後の血糖値の変化を Fig. 2 に示した。投与前は全て群のマウスも同程度の高血糖を示しているのに対し、Zn-HTSM を投与したマ

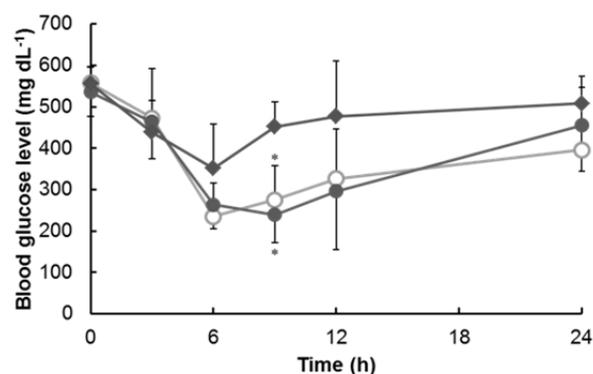


Fig. 2. Changes of the blood glucose levels in untreated KK-A^y mice (◆) and KK-A^y mice treated with Zn-HTSM of 1 mg Zn kg⁻¹ (○), or 3 mg kg⁻¹ (●) body weight by i.p. injections. Data were expressed as mean values ± SD for 5 mice. Significances: *P<0.01 versus untreated KK-A^y mice.

ウスにおいて投与 9 時間後の血糖値が無投与のマウスと比較したところ、100 mg dL⁻¹ 以上低くなった。この結果より、Zn-HTSM の血糖降下作用が示された (p<0.01, t 検定)。

2. 4 Zn-HTSM 及び Zn-ATSM の連続経口投与による血糖降下作用

Zn-HTSM が一回の腹腔内投与で血糖降下作用を有することを示した。そこで、KK-A^yマウスに1日1回14日間、亜鉛量にして10 mg kg⁻¹の割合でZn-HTSM 及びZn-ATSM を経口投与し、血糖降下作用の有無を確かめた(Fig. 3)。

Zn-HTSM を投与したKK-A^yマウスの血糖値は投与翌日から低下し、以後7日間で高血糖(約550 mg dL⁻¹)からほぼ正常値(150 mg dL⁻¹以下)に低下し、無投与マウスと比べ、より低い血糖値を14日間維持することができた。ま

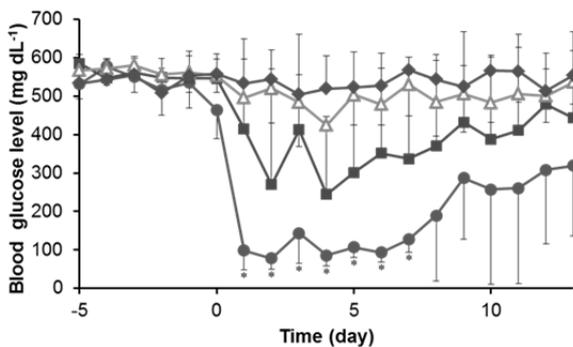


Fig. 3. Changes of the blood glucose levels in untreated KK-A^y mice (◆) and KK-A^y mice treated with Zn-HTSM (●), Zn-ATSM (■), and ZnSO₄ (Δ) at the dose of 10 mg Zn kg⁻¹ of the body weight for 14 days. Data are expressed as mean values ± SD for 3-5 mice. Significances: **P*<0.05 versus untreated KK-A^y mice.

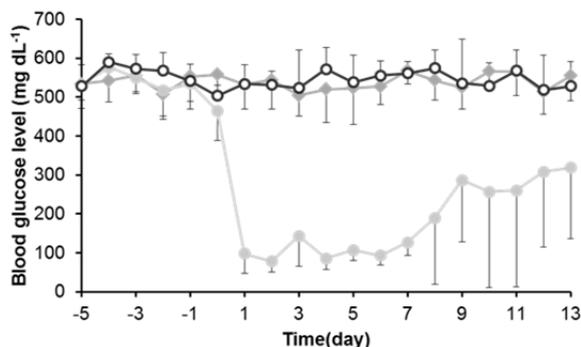


Fig. 4. Changes of the blood glucose level treated with HTSM. Changes of the blood glucose levels in untreated KK-A^y mice (◆) and KK-A^y mice treated with Zn-HTSM (●) and HTSM (○) at the dose of 10 mg Zn kg⁻¹ of the body weight for 14 days.

た、Zn-HTSM の血糖値はZn-ATSM を投与したマウスより常に100 mg dL⁻¹以上の低い値を示していたため、Zn-HTSM はZn-ATSM と比べ、強い血糖降下作用を有することが示された。

一方、亜鉛イオンコントロールとして10 mg kg⁻¹のZnSO₄のみを投与したところ、無投与マウスと同様に、血糖値の低下は観察されなかった。これらの結果から、Zn-HTSM と同量の亜鉛イオンの投与では血糖降下作用を示さないことが分かった。

またZnSO₄と同量のHTSMを投与したところ、血糖値は無投与マウスとほぼ同様の傾向を示し、血糖値の低下は見られなかった(Fig. 4)。したがって、リガンド化合物のみでは血糖降下作用を示さないことが明らかとなった。

2. 5 経口糖負荷試験(OGTT)による耐糖能改善作用の評価

Zn-HTSM 投与によりKK-A^yマウスの耐糖能の改善を調べる目的で、Zn-HTSM の14日間の連続経口投与後におけるOGTTを行ったところ、Fig. 5に示すように、無投与マウスとZnSO₄の血糖値は、グルコース投与45分後、最大濃度が約400 mg dL⁻¹まで上昇した。一方、Zn-HTSM 投与群は、無投与マウスと比較してグルコース投与後の血糖値の上昇が抑制され(*p*<0.05)、Zn-HTSM は耐糖能

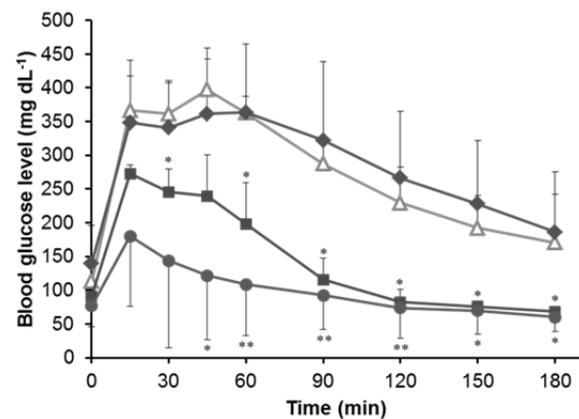


Fig. 5. Changes of the blood glucose level during oral glucose tolerance test (OGTT) of untreated KK-A^y mice (◆) and KK-A^y mice treated with Zn-HTSM (●), Zn-ATSM (■), and ZnSO₄ (Δ) at the dose of 10 mg Zn/kg of the body weight for 14 days of daily oral administration. Data are expressed as mean values ± SD for 3-5 mice. Significances: ***P*<0.01, **P*<0.05 versus untreated KK-A^y mice.

改善作用を有することが示唆された。Zn-ATSM も同様の結果を示した。

さらに、Zn-HTSM と Zn-ATSM の耐糖能を比較したところ、Zn-ATSM を投与したマウスの血糖値の最大値がおおよそ 300 mg dL^{-1} であったのに対し、Zn-HTSM 投与群の血糖値の最大値は約 200 mg dL^{-1} となり、血糖値の上昇が大きく抑制されることが分かった。併せて、Fig. 6 の血中濃度曲線下面積(AUC)を算出した結果、Zn-HTSM 投与群、Zn-ATSM 投与群の平均値は無投与群と比較してそれぞれ 33.9%、49.3%と有意な減少が認められた ($p < 0.05$, Fig. 7)。以上の結果から、Zn-HTSM は Zn-ATSM より強い KK- A^y マウスの耐糖能改善効果を有することが明らかとなった。

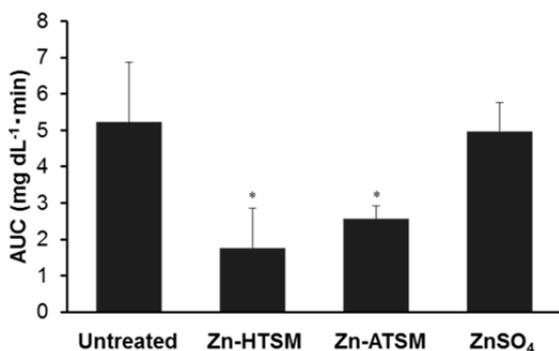


Fig. 6. The area under the curve (AUC) of the change in plasma glucose concentrations during the OGTT which were performed after the administration of Zn-HTSM, Zn-ATSM or ZnSO₄ for 14 days. Data are expressed as mean values \pm SD for 3-5 mice. Significances: * $P < 0.05$ versus untreated KK- A^y mice.

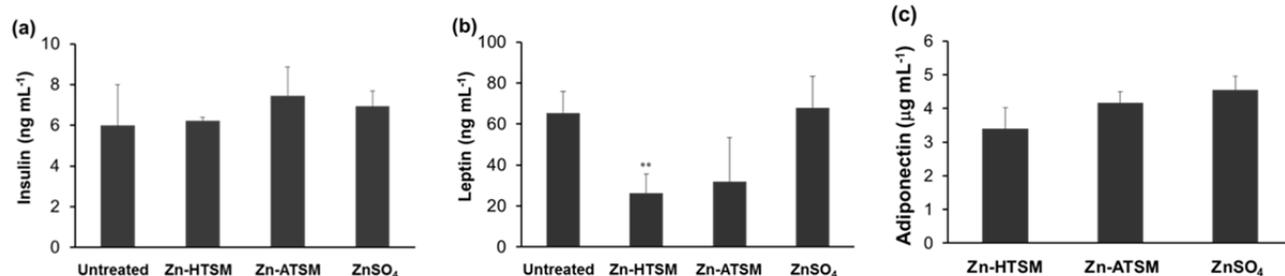


Fig. 7. The concentration of insulin (a), leptin (b), and adiponectin (c) in the serum of untreated, or Zn-HTSM, Zn-ATSM, and ZnSO₄ treated KK- A^y mice for 14 days of daily oral administration. Data are expressed as mean values \pm SD for 3-5 mice. Significances: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus untreated KK- A^y mice.

2. 6 Zn-HTSM 及び Zn-ATSM 投与マウス血清中のアディポサイトカイン解析

Zn-HTSM 及び Zn-ATSM を 14 日間連続投与した KK- A^y マウスの心臓から採血し、血清を分離した後、それぞれのレプチン、インスリン及びアディポネクチンの血清濃度を ELISA 法で測定した (Fig. 7)。インスリンやアディポネクチンの血清濃度は、無投与マウス群や ZnSO₄ 投与群と比較し、ほとんど変化がなかったのに対し、血清レプチン濃度は、Zn-HTSM 投与マウス群では 26.3 ng mL^{-1} 、Zn-ATSM 投与群のマウスでは 32.0 ng mL^{-1} を示し、無投与マウスの 65.4 ng mL^{-1} と比べ、有意に減少していることが示された ($p < 0.05$, t 検定)。

2. 7 STZ マウスにおける血糖降下作用の検討

KK- A^y マウスにおいて Zn-HTSM の連続経口投与で血糖降下作用を有することを示した。そこで、STZ マウスに 1 日 1 回 6 日間、亜鉛量にして 10 mg kg^{-1} の割合で Zn-HTSM 及び Zn-ATSM を経口投与し、血糖降下作用の有無を確かめた (Fig. 8)。

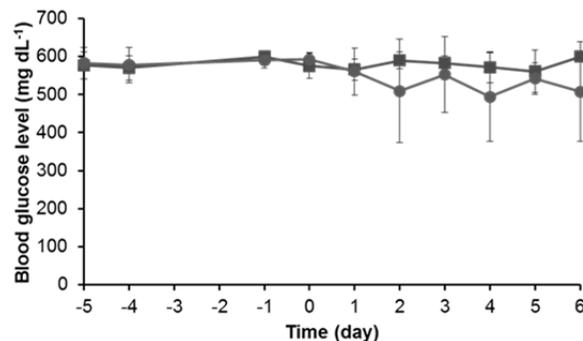


Fig. 8. Changes of the blood glucose levels in STZ mice treated with Zn-HTSM (●) and Zn-ATSM (■) at the dose of 10 mg Zn/kg of the body weight for 6 days.

いずれの錯体を投与した場合も投与期間中に血糖値は投与前の高血糖の状態からほとんど変わらなかった。この結果から、STZ マウスにおける Zn-HTSM と Zn-ATSM の経口投与では血糖降下作用を示さないことが判明した。

3. 考 察

今回、糖尿病の機能性食品としての開発を目的として、Zn-ATSM、Zn-HTSM を新たに合成し、その抗糖尿病作用を評価した。Zn-HTSM、Zn-ATSM 錯体はメチルチオセミカルバジドと各種ジケトン誘導体を酢酸酸性溶液中で還流し、得られた DTS 誘導体をメタノール中で酢酸亜鉛と還流させることで容易に合成することに成功した。合成する過程で、白色の DTS 誘導体を懸濁させたメタノール中に酢酸亜鉛を加えたところ黄色に変化したことから、リガンド化合物 DTS 誘導体が亜鉛イオンと迅速な錯形成をすることがわかった。

これまでに抗糖尿病作用を有する亜鉛錯体の研究で、その作用の強さが主にリガンドの脂溶性や亜鉛との結合安定性と関与することが明らかにされ、多くの研究で、血糖降下作用の強さはリガンドの脂溶性に依存することが報告されている。Zn-HTSM 及び Zn-ATSM 錯体の分配係数 (PC 値) を測定したところ、Zn-HTSM は目的通り Zn-ATSM より高い脂溶性を持つことが明らかとなった (Table 1)。これは、R¹ 基のアルキル鎖を延長した結果、脂溶性が増加したと考えられる。一方、Zn-HTSM と Zn-ATSM の亜鉛解離定数は、ほぼ同程度であった。この結果も、結合安定性と DTS 誘導体の構造に関するこれまでの報告と一致している。

続いて、Zn-HTSM 及び Zn-ATSM 錯体の血糖降下作用を2型糖尿病モデルマウスである KK-A^y マウスを用いて検討した。Zn-HTSM は単回腹腔内投与、連続経口投与どちらにおいても血糖降下作用が観察された。しかしながら、単回腹腔内投与を行ったとき、投与量が亜鉛量にして 1 mg kg⁻¹ の場合も 3 mg kg⁻¹ と同様の血糖降下作用が示された。これは、低用量でも血糖降下作用を発揮する可能

性が考えられた。また、連続経口投与においては、Zn-HTSM や Zn-ATSM の投与で血糖降下作用が示された一方で、同量の亜鉛イオンのみでは血糖降下作用を示さなかった。これまでに、亜鉛は錯形成により消化管吸収されやすくなるという報告から、Zn-HTSM や Zn-ATSM 錯体も同様に消化管吸収が向上した可能性が示された。また、亜鉛にして 10 mg kg⁻¹ と同量 (152.9 μmol) の HTSM リガンド化合物を投与したところ、血糖値の低下が見られなかったことから、亜鉛と解離したリガンドは血糖降下作用を示さず、錯体から解離した亜鉛もしくは亜鉛錯体そのものが血糖降下作用を有することが示唆された。

また、Zn-HTSM 及び Zn-ATSM 錯体の持つ物理化学的性質とインスリン様作用との関係について考えたところ、錯体の脂溶性がインスリン様作用発現に大きく影響している可能性が高い。Zn-HTSM と Zn-ATSM 錯体は、亜鉛の解離定数がほぼ同程度であるにもかかわらず、Zn-HTSM のリガンドの脂溶性は Zn-ATSM より高い。このことは、Zn-HTSM の高い脂溶性が、Zn-ATSM よりも細胞膜透過性に有利に働き、標的分子にすみやかに到達した結果、インスリン様作用を示したものと考えられた。

一方で、KK-A^y マウスにおける検討に対して、1型様糖尿病モデル STZ マウスを用いた Zn-HTSM 及び Zn-ATSM 錯体の血糖降下作用の検討においては、どちらの錯体も経口投与では血糖値は下がらなかったことから、STZ マウスに対しては血糖降下作用を有さないことが示された。このことは、1型糖尿病が膵臓 β 細胞破壊によりインスリンが枯渇した状態にあることから、インスリンのない状態では Zn-HTSM が効果を発揮することができない可能性が示唆された。

文 献

1. S. Kadowaki, M. Munekane, Y. Kitamura, M. Hiromura, S. Kamino, Y. Yoshikawa, H. Saji, S. Enomoto, Development of new zinc dithiosemicarbazone complex for use as oral antidiabetic agent, *Biol. Trace. Elem. Res.*, **154**, 111-119 (2013).

Basic Approach for Development of Functional Food Containing Bittern Elements

Shuichi Enomoto^{1,2}, Makoto Hiromura², Shinichiro Kamino²

¹ Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University,

²RIKEN-CMIS

Summary

In this report, we developed Zn-dithiosemicarbazone (Zn-DTS), a new Zn-DTS complex, as an oral functional food for type 2 DM, and evaluated its antidiabetic effects. The absorption band of Zn-DTS complex were red-shifted in visible wavelength region while DTS derivatives showed colorless. The behavior might be attributed from the formation of conjugated imine structure resulting when the coordination of Zn at the N and S binding sites in DTS derivatives. In several studies, the physicochemical properties of Zn complexes has been shown that lipophilicity and binding stability are important determinants for the antidiabetic activity. These reports suggest that the bioavailability and the hypoglycemic effect of Zn complexes depend on the lipophilicity of the ligand because Zn exhibits low cellular permeability owing to the hydrophilic property. Zn-DTS complexes obviously more lowered blood glucose level than ZnSO₄. In addition, PC measurements of Zn-HTSM and Zn-ATSM revealed that Zn-HTSM had higher lipophilicity than Zn-ATSM. This implies that Zn-HTSM has gain of cellular permeability and is more likely to reach the target site than Zn-ASTM. In contrast, the K_d values of Zn-HTSM and Zn-ATSM were almost the same. This result indicates that the liberation of Zn from these ligands inside the cell might not differ between Zn-HTSM and Zn-ATSM.

We then examined the hypoglycemic effect of Zn-HTSM and Zn-ATSM in KK-A^y mice. Zn-HTSM effectively lowered blood glucose levels in KK-A^y mice by not only i.p. injection but also oral administration. When KK-A^y mice were administered Zn-HTSM by i.p. injection, a dose of 1 mg Zn kg⁻¹ body weight showed the same hypoglycemic effect as that of 3 mg Zn kg⁻¹ body weight. This result indicates that Zn-HTSM has a hypoglycemic action even with only a small dose. On the other hand, an equivalent dose of ZnSO₄ did not have effect. The glucose level gradually recovered along with the time even during continuous oral administration, whereas body weight and food intake did not change (data not shown). The previous studies have reported that the blood glucose level decreased once again by increased dosage of zinc complexes. Although we have not yet evaluated high dosage of Zn complexes, long-term oral administration of a certain amount of Zn complexes raise the possibility that the reactivity to zinc complexes are diminished by an unknown mechanism. Our study indicates that Zn-DTS shows promise as an oral functional food for the type 2 DM.