



糖質科学と健康長寿をつなぐ

丸共バイオフーズ株式会社

コンドロイチン硫酸オリゴ糖の吸収性

経口摂取による吸収性の根拠資料

弊社では、エイ軟骨抽出物からコンドロイチン硫酸を取り出し、さらに特許技術のマイクロ化学プロセス処理によりナノ型コンドロイチン（コンドロイチン硫酸オリゴ糖）を製造しています。

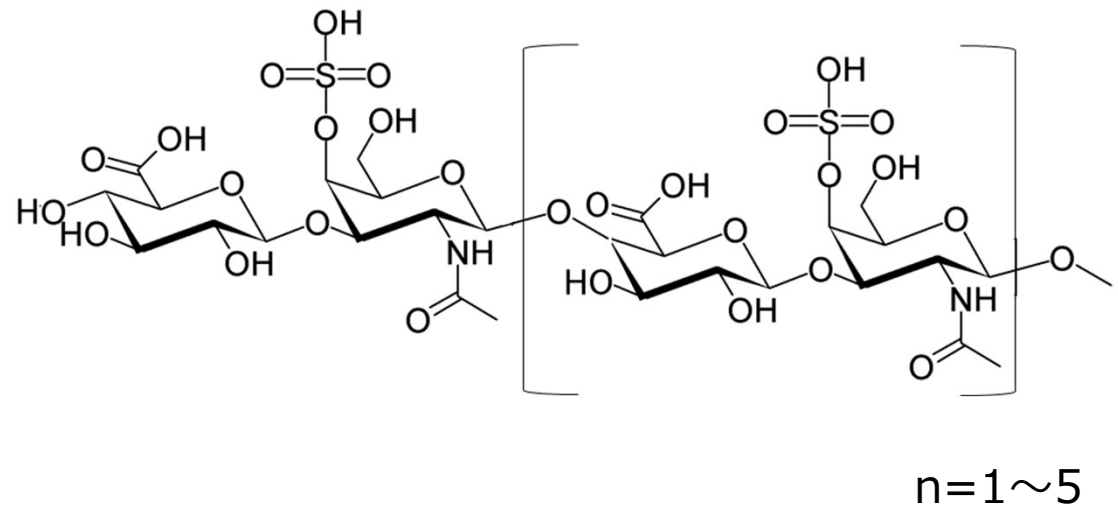
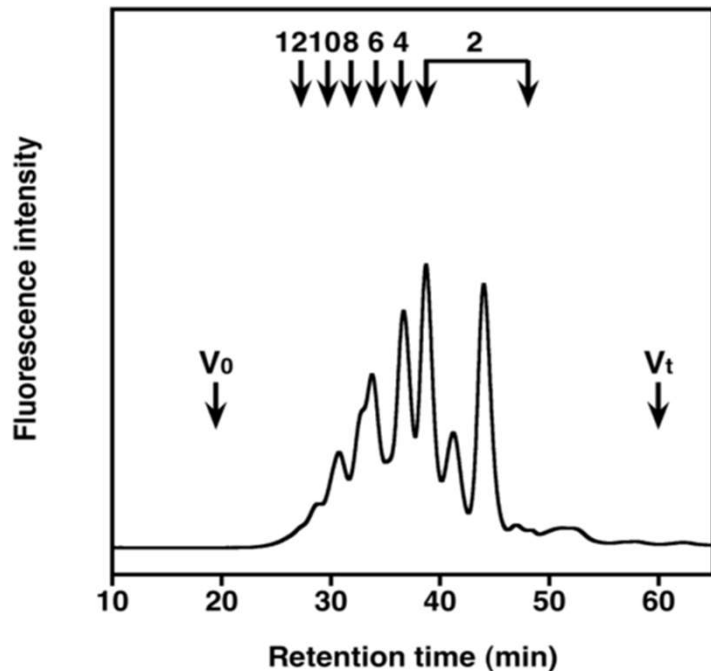
天然のコンドロイチン硫酸は分子量が十数万と大きいいため、経口摂取しても腸管からはほとんど吸収されないという懸念がありました。しかし、コンドロイチン硫酸オリゴ糖は平均分子量が3,000以下と小さいため、経口摂取で腸管から吸収され、血液中へ移行することが弊社研究から明らかになりました。

このことから、コンドロイチン硫酸オリゴ糖は、薬理的にも優れた効果を発揮することが期待できます。

※ナノ型コンドロイチンとは、物質名：コンドロイチン硫酸オリゴ糖の商品名（商標）であり、重量平均分子量がおおよそ3000以下である、コンドロイチン硫酸オリゴ糖2～16糖程度の組成物である。

コンドロイチン硫酸オリゴ糖の構造と組成

- 大きさ：主に12糖から2糖までの糖鎖オリゴマー
- 糖鎖構造：ほとんどが、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）の6位が硫酸化されたコンドロイチン硫酸のオリゴマー。偶数糖および奇数糖が存在する。偶数糖は非還元末端がグルクロン酸（GlcA）であるもののほか、非還元末端がGalNAcであるものを含む。奇数糖は、両端がGlcAであるものと、GalNAcであるものを含む。当社のコンドロイチン硫酸オリゴ糖は、これら4つの糖鎖オリゴマーの混合物である。加水分解反応により生成されるため、いずれの非還元末端C4-C5にも二重結合を持たない。



Kawahara, et al., *Bulletin of Applied Glycoscience*, 11(2), 94-99, 2021

コンドロイチン硫酸オリゴ糖は平均分子量2000の水溶性酸性糖である

I 腸管膜透過性

ラット反転腸管を各被験物質（コンドロイチン硫酸オリゴ糖:Mw2000, 高分子コンドロイチン硫酸:Mw150000）20 μ g/mL溶液に浸漬し、37 $^{\circ}$ CでO₂95%-CO₂5%混合ガスを吹き込みながらそれぞれ30分、60分反応させた。反応後、反転腸管内に透過した内液を採取し、カルバゾール硫酸法でコンドロイチン硫酸濃度を測定した。（表1）

また、HPLCでサイズ分離カラムによる糖組成分析を行った。

反転腸管試験は天然素材探索研究所（東京,渋谷）、コンドロイチン硫酸の分析は北海道大学大学院先端生命科学研究院（北海道,札幌）にて実施した。

表1. 反転腸管内へ透過した水溶液中のコンドロイチン硫酸濃度

経過時間(min)	0	30	60
	外液 CS (μ g/mL)	内液CS (μ g/mL)	
CS多糖	20,000	ND	4
CSオリゴ糖	20,000	ND	989

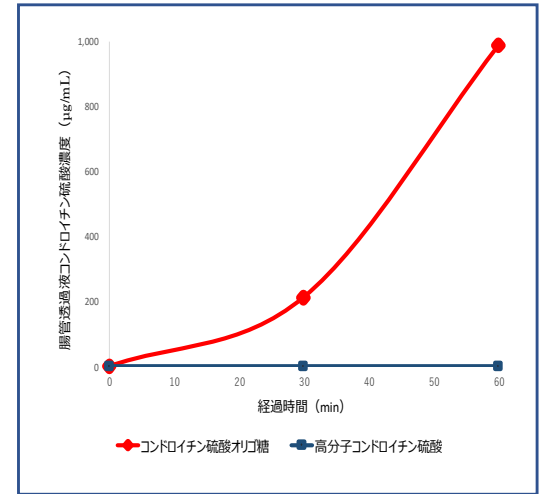
ND : Not Detected

コンドロイチン硫酸オリゴ糖試験区では、時間とともに腸管透過液中にコンドロイチン硫酸のピークが検出された。一方、高分子コンドロイチン硫酸試験区では、ほとんど検出されなかった。

I 腸管膜透過性

ラット反転腸管を各被験物質(コンドロイチン硫酸オリゴ糖:Mw2000,高分子コンドロイチン硫酸:Mw150000) 2wt%溶液に浸漬し、37°CでO295%-CO25%混合ガスを吹き込みながらそれぞれ30分、60分反応させた。反応後、透過した内液を採取し、カルバズール硫酸法でコンドロイチン硫酸濃度を測定した。(右図) また、HPLCでサイズ分離カラムによる糖組成分析を行った。(下図) 反転腸管試験は天然素材探索研究所(東京,渋谷)、コンドロイチン硫酸の分析は北海道大学大学院先端生命科学研究院(北海道,札幌)にて実施した。

コンドロイチン硫酸オリゴ糖では時間とともに腸管透過液中にコンドロイチン硫酸のピークが検出された。一方、高分子コンドロイチン硫酸では見られなかった。

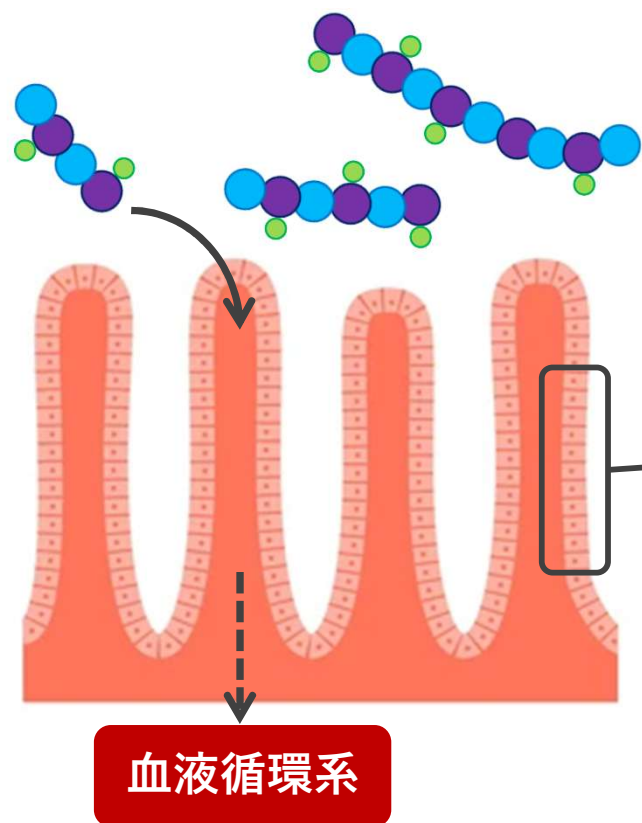


経過時間 (min)	0	30	60
コンドロイチン硫酸オリゴ糖			
高分子コンドロイチン硫酸			

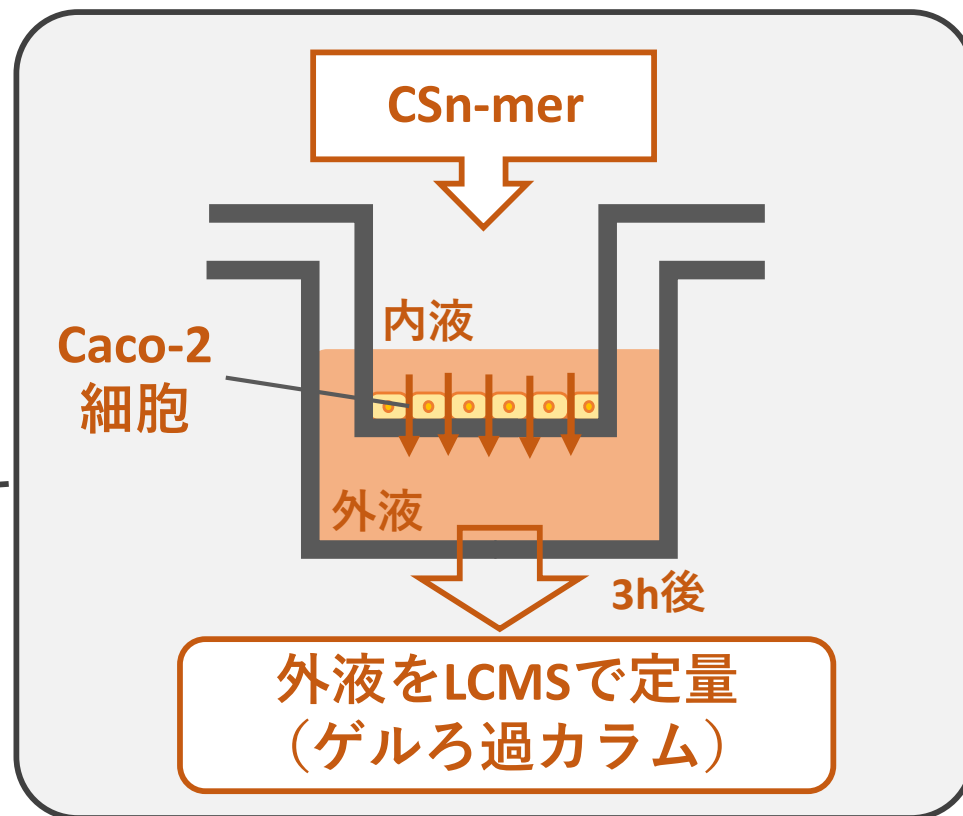
コンドロイチン硫酸オリゴ糖は腸管膜を透過する。一方、高分子コンドロイチン硫酸は透過しない。

II Caco-2細胞膜CSn-mer透過性評価（小腸吸収モデル）

■小腸でのCS吸収



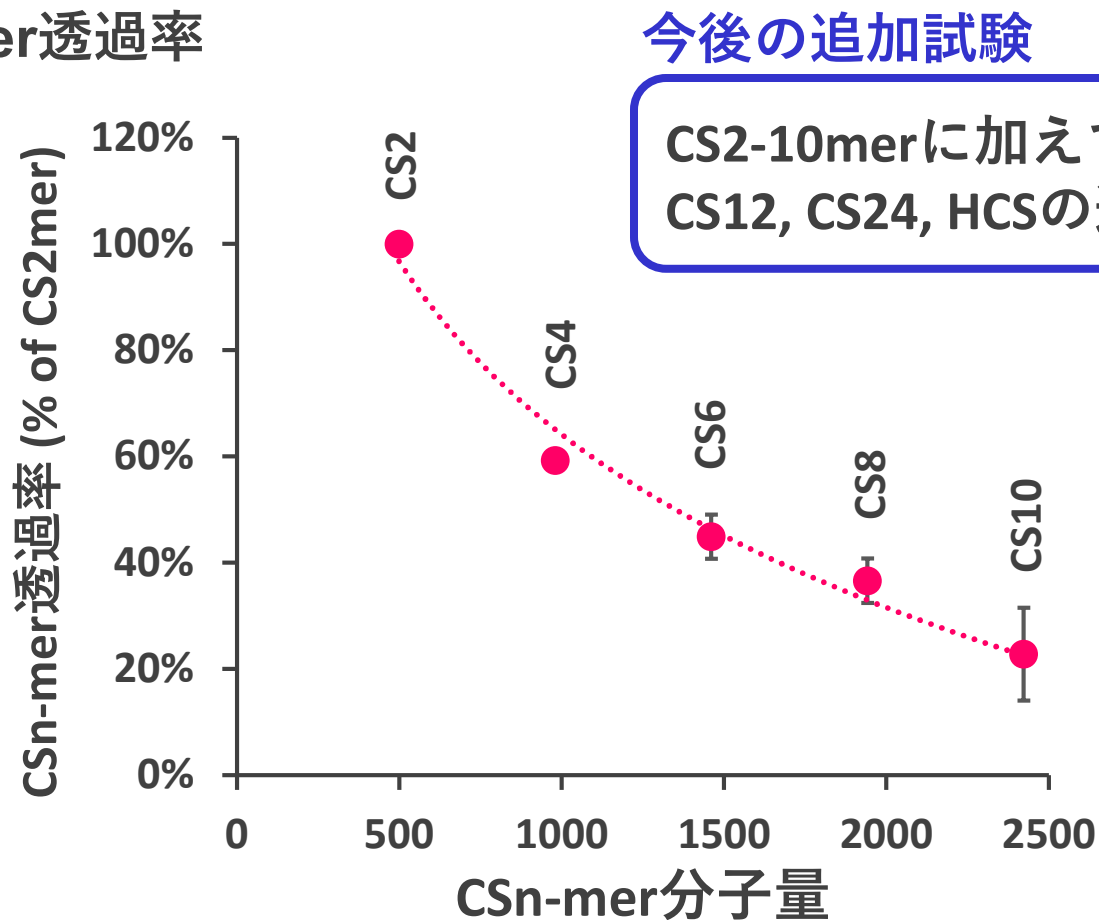
■Caco-2小腸吸収モデル



Caco-2小腸吸収モデルはヒト小腸を再現

II Caco-2細胞膜CSn-mer透過性評価（小腸吸収モデル）

■ CSn-mer透過率

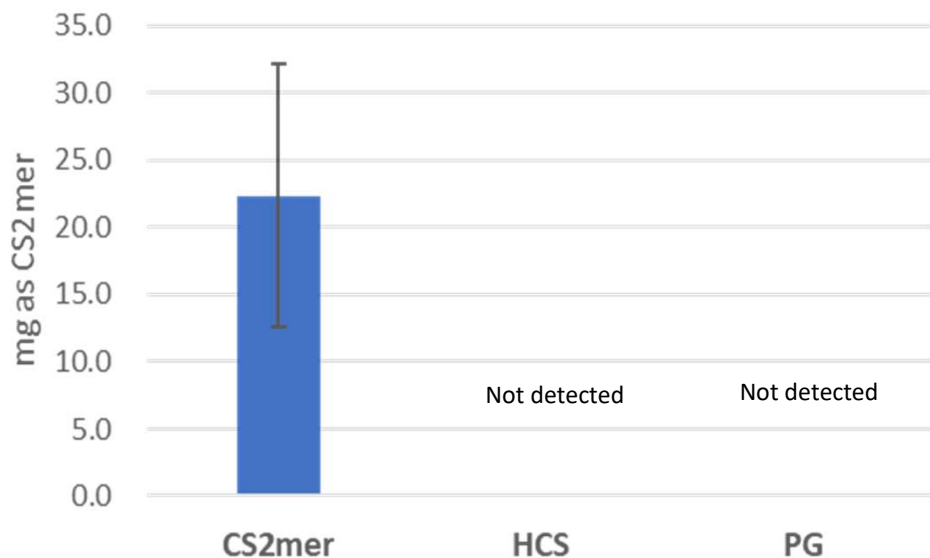


低分子量のコンドロイチン硫酸オリゴ糖ほど小腸吸収性が高い

Ⅲ ラット経口投与試験

被験物質400mgをラットに経口単回投与し、0～24時間および24～48時間のすべての尿を回収して、含まれる被験物質の量を定量した。24～48時間の尿にはいずれも検出されなかったため記載は省略した。定量は共通の成分であるコンドロイチン硫酸二糖として分析した。

ラット一尾当たりの被験物質投与後
24時間尿中排泄量合計 (mg/head)

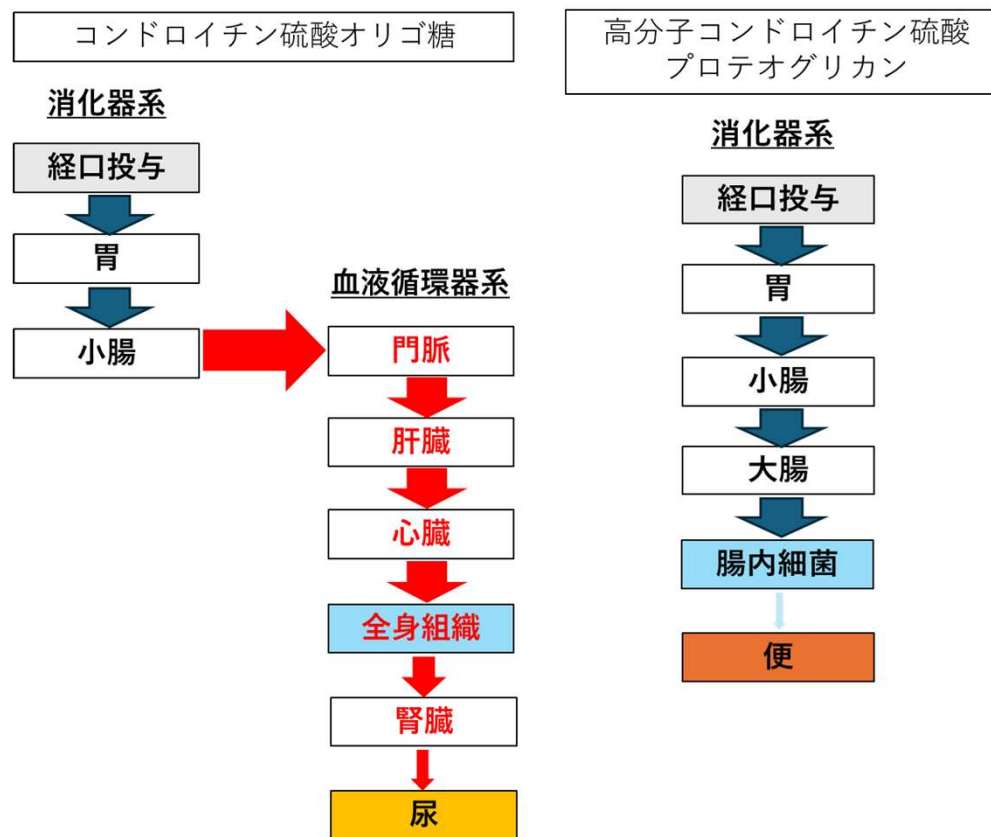


CS2mer: コンドロイチン硫酸二糖 (ナノ型コンドロイチン構成成分)
HCS: 高分子コンドロイチン硫酸 (コアタンパクから遊離したコンドロイチン硫酸)
PG: プロテオグリカン (コアタンパクに結合した状態のコンドロイチン硫酸)

考察

コンドロイチン硫酸オリゴ糖は、小腸タイトジャンクションを通過し、浸透圧差によって水とともに血液へと移動し全身へ運ばれる。

一方、高分子コンドロイチン硫酸やプロテオグリカンのような高分子糖鎖は、小腸で吸収されず大腸へ到達し腸内細菌に消費される。

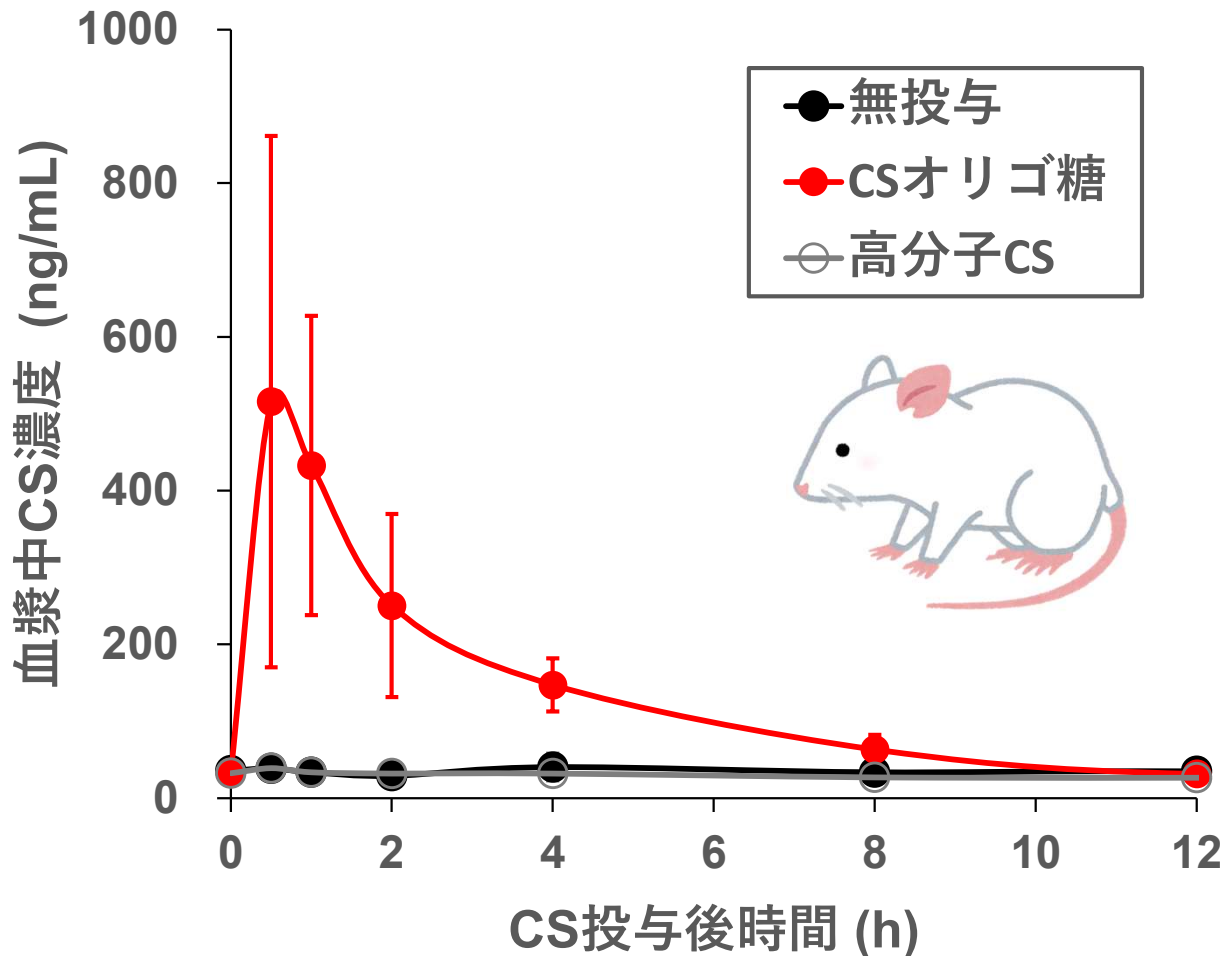


コンドロイチン硫酸オリゴ糖投与群では、尿中にコンドロイチン硫酸が検出された。

高分子コンドロイチン硫酸投与群およびプロテオグリカン投与群では検出されなかった。

Ⅲ ラット経口投与試験 (AUC)

■ 血漿中投与由来CS量の比較



■ 薬理動態パラメーター

	CSオリゴ糖投与
Cmax (ng/mL) 最大濃度	546 ± 334
Tmax (h) 最大濃度の時間	0.7 ± 0.3
T _{1/2} (h) 血中濃度半減期	1.9 ± 0.7

左図のとおり、高分子コンドロイチン硫酸投与群では、血中に検出されなかった。一方、コンドロイチン硫酸オリゴ糖投与群では血中濃度の上昇が確認された。

コンドロイチン硫酸オリゴ糖投与群のみ血漿中で吸収を確認

IV ヒト介入試験

Mizuta, et. al., Quantification of orally administered chondroitin sulfate oligosaccharides in human plasma and urine, *Glycobiology*, 2023;, cwad054 より抜粋

【Materials】

高分子コンドロイチン硫酸（HMWCS）は、橋口ら(1)の方法に従い精製したものをを用いた。コンドロイチン硫酸オリゴ糖四糖（4merCS）は、河原ら(2)の方法に従い精製したものをを用いた。

【採血】

超純水に溶解したHMWCSおよび4merCS各500mgを経口投与し、経口投与前と経口投与1, 2, 3, 5時間後にEDTA採血管にて採血を行った。採血後15分間静置し、遠心分離機にて遠心分離（2370 × G、15分）を行い、血漿を分離した。血漿サンプルは-20 °Cで冷凍保存した。

【分析】

分画分子量10,000の限外ろ過膜を備えた遠心濃縮チューブに血漿サンプルを100 μLを分取し、2 mol/L NaCl水溶液を100 μL加えピペティングで攪拌した。その後、遠心分離機にて遠心分離（12000 × G、30分）を行い、液の一部を透過した。保持液約40 μLに1 mol/L NaCl水溶液100 μLを加えピペティングで攪拌し、遠心分離にて一部を透過した。同様の操作を4回繰り返し、透過液を回収した。透過液200 μLをBiggeら（3）の方法に従い蛍光標識化した。すなわち、還元アミノ化反応によりコンドロイチン硫酸の還元末端に2-アミノベンズアミドを誘導した。分析にはゲルろ過カラムSuperdex 30 Increase 10/300 GL（Cytiva（Marlborough、MA））を装備したHPLC（島津製作所（京都、日本））を用いた。溶出には50 mmol/L NH₄HCO₃水溶液を移動相として用い、室温下0.5 mL/minの流速のもと、100 μLサンプルを供した。検出は励起波長330 nm、検出波長420 nmの蛍光にて行った。得られたクロマトグラムからピークを抽出し、ピーク面積を血漿に4merCSを後添加した較正曲線で補正することでCS血漿濃度に換算した。

【参考文献】

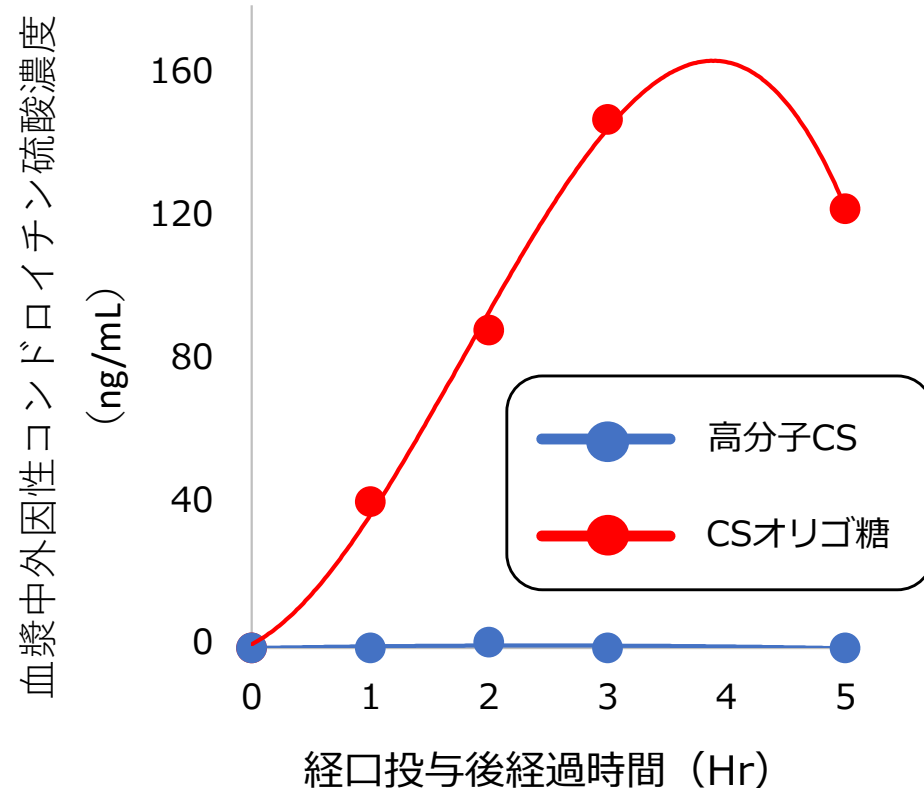
- (1) Hashiguchi, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1810, 406–413, (2011).
- (2) Kawahara, et al., *Bulletin of Applied Glycoscience*, 11(2), 94–99, (2021).
- (3) Bigge, J. C. et al., *Anal. Biochem.*, 20, 229-238, (1995).

IV ヒト介入試験

健康な成人男性に高分子コンドロイチン硫酸（HMWCS）とコンドロイチン硫酸オリゴ糖四糖（4merCS）を経口投与し、その血中濃度がどのように変化するかを調べた。それぞれを500 mg経口投与し、経口投与前と投与1, 2, 3 および 5時間後に採血を行い、血液から分離した血漿を用いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法により経口摂取された外因性のコンドロイチン硫酸濃度を測定した。

経口投与前からの時間 (hour)	外因性コンドロイチン硫酸血漿濃度(ng/mL)	
	4merCS経口投与	HMWCS経口投与
0	ND	ND
1	41	ND
2	89	1.6
3	148	ND
5	123	ND

※NDは検出できず



コンドロイチン硫酸オリゴ糖の経口投与前では投与前3時間をピークとする血中コンドロイチン硫酸濃度の経時的な上昇が確認されたが、高分子コンドロイチン硫酸の経口投与前ではどの時間においてもほとんど検出されなかった。検出された最大濃度差は100倍以上の開きがあり、コンドロイチン硫酸オリゴ糖は経口摂取によって血中に取り込まれることが確認された。

コンドロイチン硫酸オリゴ糖と高分子コンドロイチン硫酸との吸収性比較について

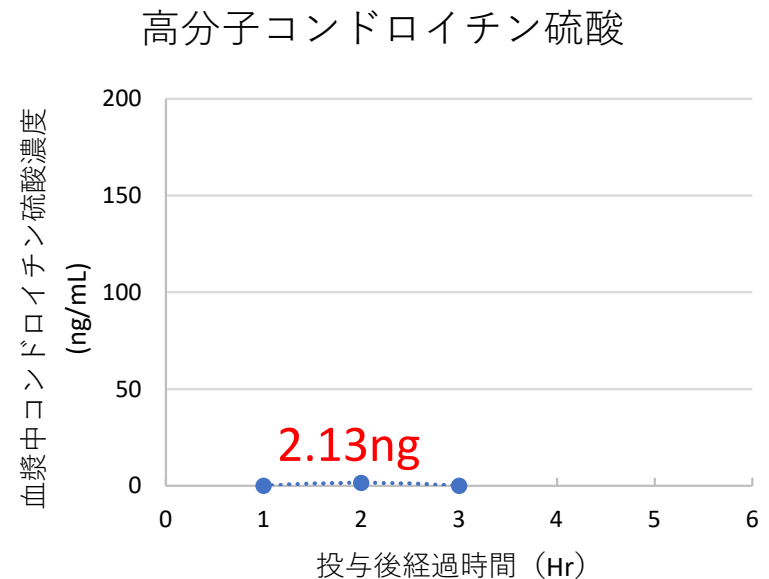
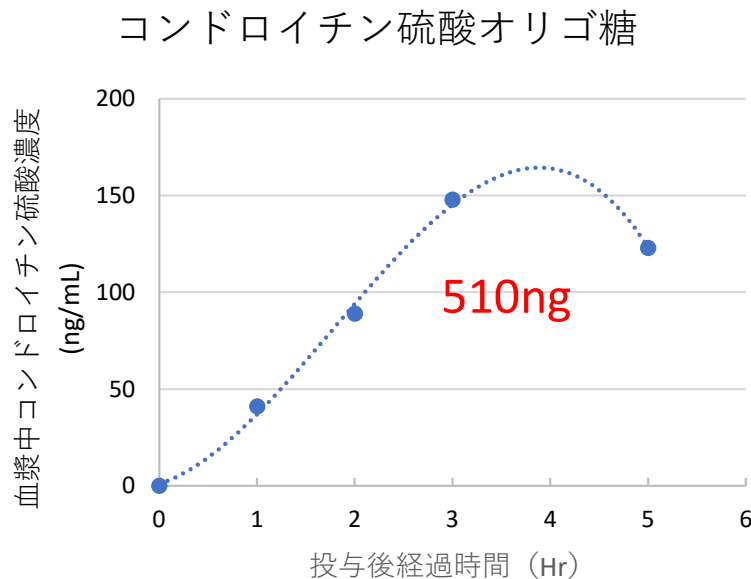
吸収性の比較では、〇〇倍という表現を用いる場合があるが、比較対象の一方がゼロに近い数値の場合は、わずかな測定値の違いによってその倍率が大きく異なるので、その取扱いに注意を要する。

すなわち、比較する数字が、100 : 0.1と100 : 0.2ではその差に意味は無いが、これを倍率とすると、前者は1000倍に対し、後者は500倍と大きく異なってしまふからである。

(1) 反転腸管試験結果(p5)から

60分後の内液中のコンドロイチン硫酸濃度を比較すると、コンドロイチン硫酸オリゴ糖試験区では989 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に対し、高分子コンドロイチン硫酸試験区では4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。従ってその倍率は、247倍であった。

(2) ヒト介入試験結果(p12)から

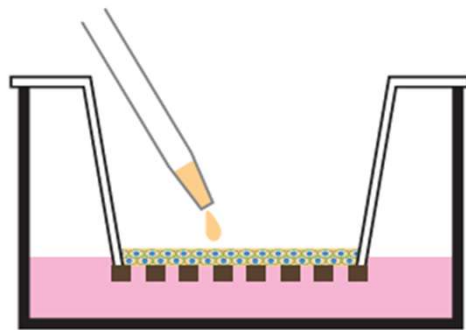


**血液に含まれる被験物質量は各群における血中濃度の近似曲線下面積を積分し求めることができる。データのあ
る0~5時間までを比較すると、510 : 2.13であるので、239倍となる。ナノ型コンドロイチン群は実際には5時
間目以降も検出されると思われるので、さらに吸収量比は高くなる。**

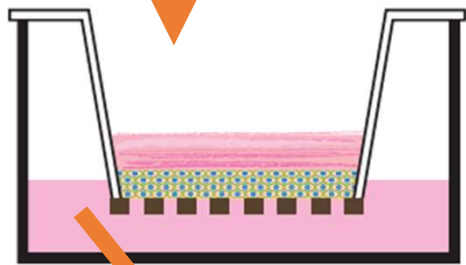
V 経皮吸収性

■ヒト3次元培養皮膚モデルにおける分子量の異なるCSの透過量

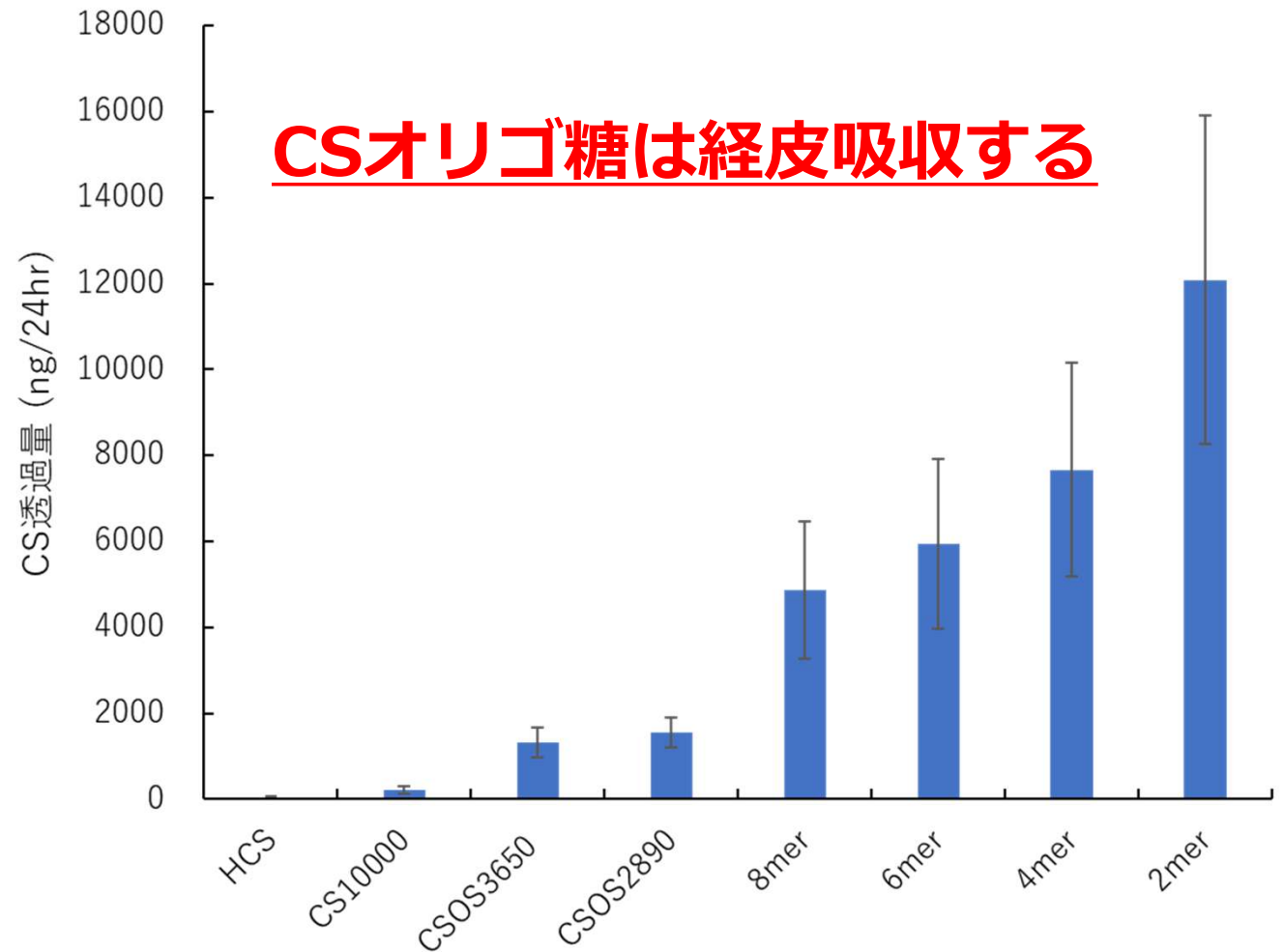
各分子量のCS添加



24時間培養



CS量測定



CSの皮膚浸透性は分子量に依存し、CS2merの浸透性はHCSの320倍であった。

CONTACT US

丸共バイオフーズ株式会社 ファインケミカル研究所

Research and Product Development in Glycan Functionality

北海道札幌市手稲区西宮の沢4条2丁目1-40 TEL 011-676-5702

URL <https://mbf-net.com>

<https://nanomedica.jp>

<https://nano10-9.jp>

Mail finechemical@mbf-net.com