

ホタテ貝殻を原料とする高吸収型カルシウム食品の人工胃液試験法による溶解性評価

鈴木 高広¹, 坂本 勝¹, 田端 宣彦², 沖野 圭修²

要旨

骨や歯などの硬組織の主成分であるカルシウムは、血液、筋肉、神経などにおいてさまざまな生理機能を担う必須ミネラルである。日本人のカルシウム摂取量は不足する傾向にあり、種々のカルシウム補給食品やカルシウム製剤が商品化されているが、消化器官での溶解性や吸収性が低いなどの問題がある。そこでカルシウム補給剤の溶解性や吸収効果を高めると共に、食品としての用途を拡大するために、ホタテ貝殻を原料とした微粒子クエン酸カルシウム製剤 (Nano-CAL) を用いて、溶解性や分散性に関する評価試験方法を検討し、カルシウム補給食品としての機能性の評価を行った。

はじめに、人工胃液を天然ミネラル水で段階的に希釈した水溶液を用いて各種 Ca 製剤 (クエン酸カルシウム粉末、炭酸カルシウム剤) の溶解性と pH の変化を解析した。その結果、微細粒子状のクエン酸カルシウムは大粒子状のクエン酸カルシウムや炭酸カルシウム剤よりも分散性や溶解性が高いことが判明した。また、苦味を呈する Nano-CAL(b) の溶解性ももっとも高く、次いで酸味型 Nano-CAL(a) の溶解性が高く、無味型の Nano-CAL(n) は溶解性が低いことが分かった。これらの結果から、製剤粒子中の Ca イオンとカルボン酸イオンの偏在性や不均衡な含有量が溶解度を高めていることが示唆された。そこで、Nano-CAL(n) の溶解性を高める方法を検討したところ、乳鉢で摩砕し微粒子化すると分散性が高まり、また、ポリグルタミン酸を添加すると溶解度が一段と高まることが明らかとなった。また、豆乳へ Nano-CAL(n) 剤を過飽和濃度で添加したところ、Ca 濃度を牛乳相当濃度 (1.2 mg/ml) に高めた場合でも豆乳成分の分散性や均一性が保持されており、豆乳タンパク質が Ca の分散剤として機能することが示唆された。

キーワード：カルシウム食品、人工胃液、クエン酸カルシウム、ホタテ貝殻、溶解性

原稿受付 2020年1月20日、受理日 2020年2月25日

1. 近畿大学生物理工学部生物工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. ユニカ食品株式会社 〒150-0002 東京都渋谷区渋谷 3-8-11 渋谷三丁目 TR ビル 9F

1. 結論

ミネラル成分の中で体内に最も多く含まれるカルシウム Ca は体重の 1~2% を占め、骨や歯の主成分であるだけでなく、神経筋興奮、血液凝固、生理活性物質の分泌、筋肉の収縮・伸長・興奮性の抑制、酵素反応、ホルモンや神経伝達物質の放出反応、ホルモンの細胞内情報伝達作用など、生命を維持する上で重要な生理機能の調節を担う。血液中の Ca 濃度はビタミン D、副甲状腺ホルモン、カルシトニン、エストロゲン、男性ホルモンなどによって厳密に一定濃度範囲に維持されており⁽¹⁾、血液中の Ca が不足すると骨から溶出し補給する⁽²⁾。このため Ca 摂取量が不足すると骨や歯が弱くなり、幼児では骨の発育障害が起こる。カルシウムの摂取不足が長期間続くと骨密度が低下し丈夫な骨が形成できなくなり、高齢期、特に閉経後の女性では骨粗鬆症が起こりやすくなる。また、神経や筋肉の興奮が高まり、筋肉の痙攣が起こりやすくなると考えられている⁽³⁾。

Ca は乳・乳製品、魚介類、大豆製品、種実類、藻類などに多く含まれ、食事による 1 日の摂取推奨量は腸管からの吸収率、骨代謝、尿中排泄等を考慮し、18~29 歳男性で 800 mg、30~49 歳男性で 650 mg、50 歳以上の男性で 700 mg、18 歳以上の女性で 650 mg としている⁽⁴⁾。これに対し日本人 1 日 1 人当たりのカルシウム平均摂取量は 514 mg (平成 29 年) と目標を充たしていないのが現状である⁽⁵⁾。

1946 年以降、炭水化物やタンパク質、ミネラルなど日本人の主な栄養摂取量は徐々に上昇し 1997 年にピークに達したが、近年は減少傾向にある。同様に高校 3 年進学時の平均身長も 1997 年をピークに上昇傾向が止まり、身長に対する座高の割合も低下傾向から増加傾向へと転換した⁽⁶⁾。これらの統計データは、栄養摂取量の変化が乳幼児や青少年の発育に大きく影響を及ぼしていることを示し、特に Ca 摂取量の不足により全身の骨格形成や骨量の割合が高い下肢の発育が抑えられたことが、短足化と身長伸びの抑制の主因であることが示唆される。

このように現代の乳幼児や青少年は、発育期において Ca 摂取量の不足が身長伸びや下肢の形成が抑制されている可能性があり、将来的には骨量が不足したまま成人となった国民全体の健康維持や老後生活にも多大な影響を与えることも懸念される。食事による Ca 摂取量不足を補うために、既に種々の Ca 補給食品や Ca 製剤が商品化されており、ドラッグストアやコンビニエンスストア、スーパーマーケット、ネット販売など、セルフタイプの販売網で幅広く供給されている。それにも関わらず上述のようにカルシウムが不足している原因として、主に二つの理由が考えられる。

一つは、国民の Ca 摂取量不足に関する健康障害や老後障害への情報や知識が不十分であり、Ca 不足の影響が社会的に軽視されているからである。Ca 不足による健康障害は長期的な分析と観察が必要なため、因果関係を明確化することが困難であることも原因の一つである。

Ca 不足のもう一つの要因は、Ca の低い吸収性にある。食品や補給剤中の Ca は胃酸によって溶解し Ca イオンとなって腸に送られ十二指腸で吸収される⁽⁷⁾。食品中の Ca の人体への吸収率は牛乳 53%、小魚 38%、野菜 18% であるのに対し、アコヤ貝やカキ殻などから調製された炭酸カルシウム CaCO_3 製剤による Ca 吸収率は 42% と小魚や野菜よりも高いことが報告されている⁽⁸⁾。微粒子に加工した CaCO_3 剤は胃酸でイオン化しやすいため、吸収率が高まると考えられている⁽⁹⁾。

十二指腸でミネラルが吸収されるためには溶けた状態のまま腸管内で分散していることが必要である。酸性胃液で可溶化した Ca イオンは、小腸下部に達すると pH が中性から弱アルカリ性へ変わるため、再石灰化により不溶化することで体内に吸収されずに排泄されてしまう割合が増える⁽¹⁰⁾。小魚や肉類のカルシウムはリン酸イオンと結合し不溶性のリン酸 Ca が形成されるため吸収されにくく、牛乳中のカルシウムの吸収率が高いのは、牛乳タンパク質のカゼイン消化物である CPP (カゼインホスホペプチド) が、小腸でカルシウムとリンの結合を阻止しカルシウムを吸収されやすい状態に保つからであると報告されている⁽¹¹⁾。同様に難消化性デキストリ

ンやクエン酸などのキレート剤が Ca の不溶化を防ぎ、小腸内の分散性を高めることで Ca 吸収を促進することが動物実験で確認されている^(12, 13)。

一方、Ca 製剤を飲食物と共に摂取する場合には、飲食物の水分により胃酸が希釈および中和されるため^(14, 15)、胃内の Ca イオン化率が低下し小腸での吸収率も低下すると考えられている。したがって Ca 製剤の吸収性の評価には、飲食物の水分で希釈および中和された胃液希釈液におけるイオン化率や溶解率が重要であると考えられる。しかし、希釈された胃液条件下における Ca 製剤の溶解性や吸収性についてはこれまでほとんど検討されてこなかったのが実状である。

このような現状を背景として Ca 補給剤の溶解性を胃液が希釈された条件下で評価する試験方法を検討すると共に、飲食物へ添加した場合に味覚や嗜好性を損なうことなく分散性や溶解性を高める方法を検討した。

2. 材料と方法

2. 1 カルシウム製剤

北海道産ホタテ貝殻を原料とするカルシウム製剤として開発した微粉末 Ca 製剤（試料名：Nano-CAL）を実験に用いた。天然ホタテ貝殻を粉砕および焼成して得られた酸化カルシウム CaO をクエン酸で中和したスラリーに各種配合剤を添加したのちスプレードライヤー法により細粒化した生成品は CaO とクエン酸の反応条件により食味が異なるため、酸味を呈する場合を Nano-CAL(a)、苦味型を Nano-CAL(b)、無味型を Nano-CAL(n) と分類し溶解性試験に用いた。

比較試料として、従来品である顆粒状 Ca 製剤（試料名：UNICAL）、および市販の CaCO₃ 製剤として食感改良、流動性改良、pH 調整、膨脹剤、即席麺、菓子類、ガムベース、飲料等に使用されている貝殻由来の炭酸カルシウム製剤（試料名：CaCO₃ 剤、他社品）を使用した。

表 1 に実験に用いた 5 種類の Ca 製剤の特徴をまとめた。粒子径は各 Ca 製剤を蒸留水に分散した時の公称値（参考値）を示す。

表 1 実験に用いた Ca 製剤

試料名	主成分	Ca 含有率 (表示値)	粒子径 (μm) (参考値)	摘要
Nano-CAL(n)	クエン酸カルシウム	18%	0.4~2	無味型
Nano-CAL(a)	クエン酸カルシウム	18%	0.4~2	酸味型
Nano-CAL(b)	クエン酸カルシウム	18%	0.4~2	苦味型
UNICAL	クエン酸カルシウム	18%	30~50	従来品（市販品）
CaCO ₃ 剤	炭酸カルシウム	40%	5~8	比較品（市販品）

2. 2 人工胃液希釈試験液の調製

胃酸液および希釈胃酸液における Ca 製剤の溶解性を比較するために、人工胃液を用いた溶解性試験方法を検討した。人工胃液には、医薬品の溶解性や錠剤の崩壊性試験に汎用されている市販の溶出試験第 1 液（関東化学）を用いた。飲食により胃酸が希釈および中和された場合の Ca 製剤の溶解性を調べるために、はじめに人工胃液中和液の調製法を検討した。中和試液には NaOH および市販のミネラルウォーター（奥大山の天然水、サントリー）を用いた。NaOH を用いた場合は、人工胃液に対し NaOH 濃度 (mM) を 0, 70, 93, 98, 105, 115, 120, 125, 130 の 9 段階に調製し pH の変化を調べた。一方、天然水で希釈した場合は、人工胃液の濃度を段階的に

変えた場合の希釈液の pH の変化を調べた。そして、この結果に基づき人工胃液濃度 (%) を 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 の 10 段階に設定し Ca 製剤の溶解性試験に用いた。

2. 3 Ca 製剤の人工胃液溶解性試験

上記試験に基づき選択した 10 段階の濃度に設定した人工胃液希釈液に各種 Ca 製剤を添加し溶解試験を行った。Ca 製剤添加量は、胃体積 1 L 当たり Ca 670 mg (成人 1 日の推奨摂取量) に調製するために、溶解液 10 mL に対し Nano-CAL と UNICAL は 37 mg (Ca 6.7 mg) , CaCO₃ 剤は 16.7 mg (同) とした。

Ca 製剤の溶解度の測定は、所定量の試料を人工胃液希釈液に懸濁し攪拌したのち、30 分間室温で静置した懸濁溶液を再度均一に攪拌し濁度 OD (光源波長 660nm) を測定し溶解度を求めた。Ca 製剤濃度と OD の関係は、Ca 製剤の飽和水溶液に対し Ca 製剤を段階的に添加し、不溶性 Ca 製剤の懸濁濃度と OD の関係から求めた。また、溶解液の pH を測定し Ca 製剤が人工胃液の pH に与える影響を比較した。

次に、Ca 製剤の摂取量を変えた場合の人工胃液希釈液への溶解度と pH の変化を比較するために、Nano-CAL 製剤 (n, a, b) をそれぞれ酸性、中性、塩基性の三種類の水溶液に対し 5.7 mg/mL (Ca= 1.0 mg/mL) , 3.7 mg/mL (Ca= 0.67 mg/mL) , 2.2 mg/mL (Ca= 0.40 mg/mL) , 1.1 mg/mL (Ca= 0.20 mg/mL) の 4 段階の濃度で添加し溶解度試験を行い比較した。酸性液は人工胃液 5% 希釈液、中性液は天然水、塩基性液には NaOH 70 mM/天然水の各溶液を用いた。

2. 4 ポリグルタミン酸添加溶解性試験

Ca 製剤は Nano-CAL(n) と Nano-CAL(a) を用いて、二種類の溶解液 (天然水および人工胃液 5% 希釈液) に対し 3.7 mg/mL (Ca= 0.67 mg/mL) の濃度に設定し、ポリグルタミン酸 (PGA, 味の素株式会社) の添加効果を比較した (図 1) 。溶解性試験液に対し PGA 濃度を 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 mg/ml の 10 段階に設定し、Ca 製剤の溶解度と pH の変化を比較した。

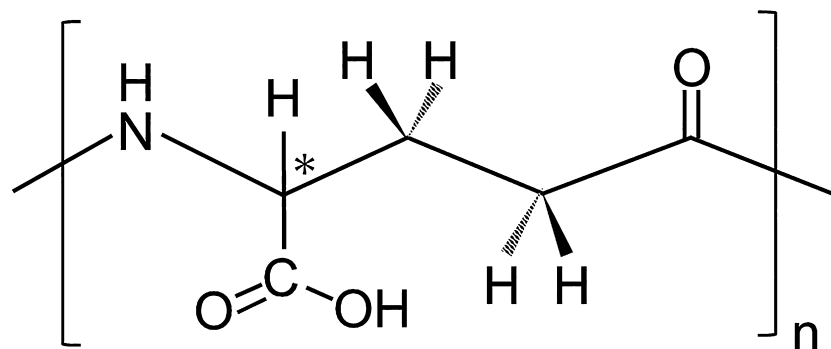


図 1 ポリグルタミン酸の構造

2. 5 Ca 製剤の粉砕溶解性試験

CaCO₃ 剤と Nano-CAL(n) を乳鉢と乳棒を用いて 5, 10, 15 分間摩砕し微粒子化した粉体の分散液 (Ca=0.67 mg/ml, 人工胃液 5% 希釈水) に対し、PGA を 2 mg/ml 添加し溶解度と pH の変化を比較した。

2. 6 豆乳への Ca 製剤添加試験

豆乳への Ca 強化剤としての配合適性を評価するために、市販の豆乳（成分無調整）に対し滅菌処理した Nano-CAL(n)を 6 mg/ml (Ca 1.1 mg/ml) , 12 mg/ml (Ca 2.2 mg/ml), 18 mg/ml (3.2 mg/ml), 2.4 mg/ml (4.3 mg/ml)配合し 10 日間冷蔵保存したのち分散安定性を比較した。

2. 7 粒子径分布と走査型電子顕微鏡観察

蒸留水に分散した Ca 製剤微粒子を、粒子径分布測定装置（マイクロトラック MT3000）を用いて測定した。また、カーボンテープ面に塗布した Ca 製剤試料を、走査型電子顕微鏡（Hitachi S-3400N）を用いて 400 倍、2000 倍、10000 倍の拡大倍率で観察し一次粒子と造粒構造の形状とサイズを比較した。

3. 結果

3. 1 人工胃液試験液の調製法

図 2 は、人工胃液に段階的に NaOH 添加量を変えた場合の pH の変化を示す。NaOH 濃度が 93 mM までは pH が 3.0 以下と酸性だったが、98 mM に高めると急激にアルカリ性側にシフトした。このように人工胃液には pH 緩衝機能がなく、飲食により胃酸が中和された場合の Ca 製剤の溶解性試験液の調製において、NaOH を添加し pH を段階的に調節することは困難であることが分かった。

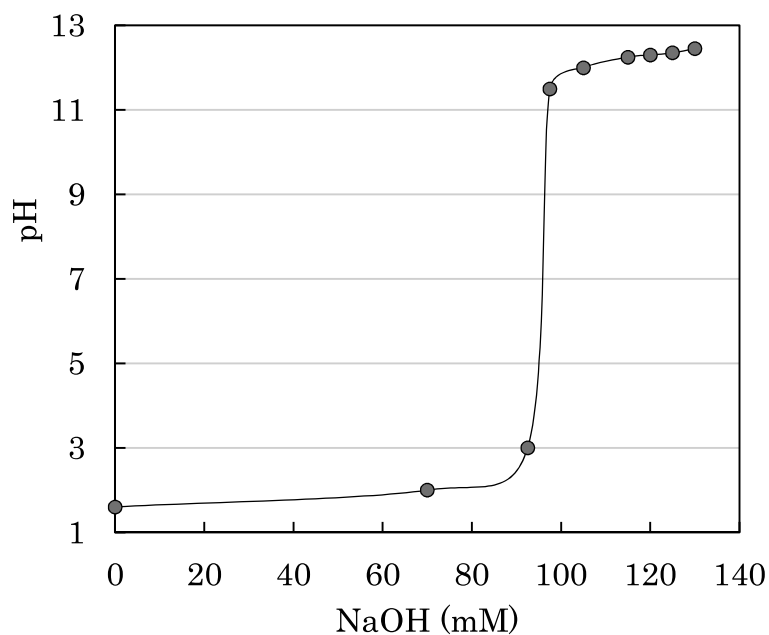


図 2 人工胃液に添加した NaOH 濃度と pH の変化

図 3 は、人工胃液を天然水で段階的に希釈した場合の pH の変化を示す。人工胃液を天然水で希釈した場合は、pH 3~7 の間で段階的に pH を調節した希釈液を調製可能であることが分かった。実際の胃においても、飲食による水分により胃液が希釈されることを考慮すると、天然水で人工胃液を希釈する方法が胃内 pH 環境と

類似した消化条件であると考察される。この結果に基づき人工胃液と天然水の配合率を10段階に設定し、pH 1.3～6.9の条件におけるCa製剤の溶解度の解析に用いた。

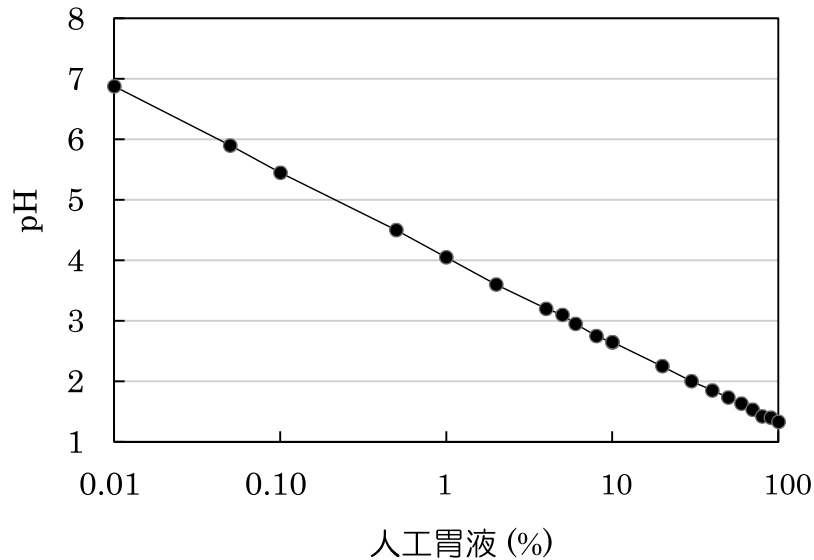


図3 天然水で希釈した人工胃液濃度と pH の関係

3. 2 人工胃液希釈液による Ca 製剤の溶解試験

図4は、人工胃液を天然水で希釈した水溶液に対する各Ca製剤の溶解度の変化を示す。人工胃液30%希釈液はNano-CAL(a, b, c)をほぼ全量溶解したのに対し、UNICALやCaCO₃剤の溶解度はやや低下した。人工胃液をさらに希釈すると各Ca製剤の溶解度の差が明確となり、5%希釈液ではNano-CAL(b)の溶解度が63%、Nano-CAL(a)が51%、Nano-CAL(n)が46%、UNICALの溶解度は42%だったのに対し、CaCO₃剤は18%に低下した。

2%希釈液ではNano-CAL(n)の溶解度は13%となり、CaCO₃剤(溶解度10%)と同程度の溶解度に低下したのに対し、Nano-CAL(a)とUNICALは30%前後、Nano-CAL(b)は54%となった。

このように苦味のあるNano-CAL(b)がもっとも溶解度が高く、無味型Nano-CAL(n)は人工胃液濃度を5%以下に低下した場合にNano-CAL(a)やNano-CAL(b)よりも溶解度が低下することが分かった。また、CaCO₃剤は溶解性が低いことが明らかとなった。

UNICALとNano-CAL(a)は、人工胃液濃度5%以下の希釈水に対する溶解度は両方とも同水準となったのに対し、人工胃液濃度10%～30%の範囲では粒子径が小さなNano-CAL(a)の方がUNICALよりも溶解度が高いことが分かった。

図5は、人工胃液希釈液の初期pHに対する各Ca製剤の溶解度の変化を示す。人工胃液濃度30%の場合はpHが2.0と酸性でありCa製剤はほぼ全量溶解した。人工胃液濃度を20%に希釈した場合はpHが2.25に上昇し、CaCO₃剤の溶解度が54%、UNICALが84%に低下した。一方、Nano-CALは3タイプとも99%と高い溶解度を示した。

人工胃液濃度を5%に希釈した場合はpHが3.0に上昇し、CaCO₃剤の溶解度が18%に低下したのに対し、UNICALは42%、Nano-CAL(a)は46%、Nano-CAL(a)は51%、Nano-CAL(b)は63%と溶解度に大きな差が生じた。

このように人工胃液濃度に依存して水溶液の初期 pH が大きく変化した結果、各 Ca 製剤の溶解度も大きく変化したことが分かる。そこで次に、各 Ca 製剤の溶解成分が水溶液の pH に与える影響を分析した結果を図 6 に示す。同図は、人工胃液希釈液の初期 pH に対し、各 Ca 製剤を添加し溶解実験を行った後に測定した溶解液の pH を示した。

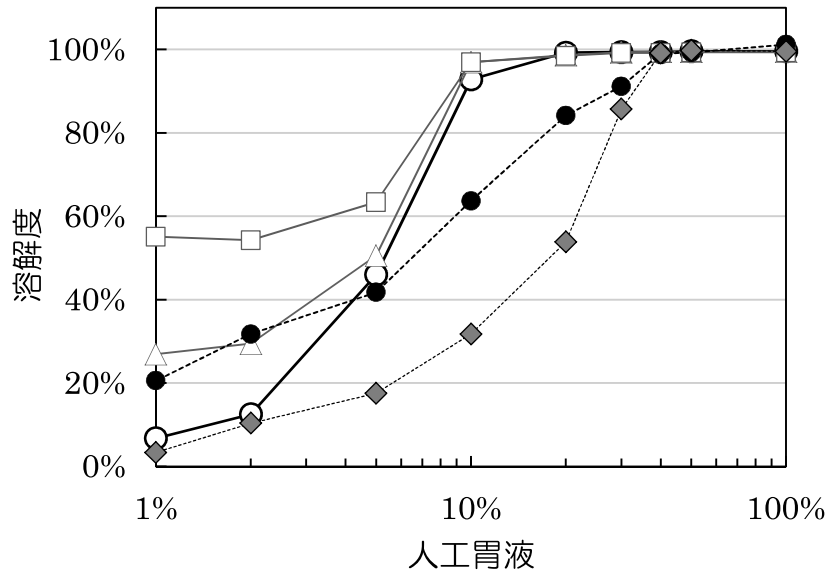


図 4 人工胃液濃度に対する Ca 製剤の溶解度の変化

○ : Nano-CAL(n), △ : Nano-CAL(a), □ : Nano-CAL(b), ● : UNICAL, ◆ : CaCO₃

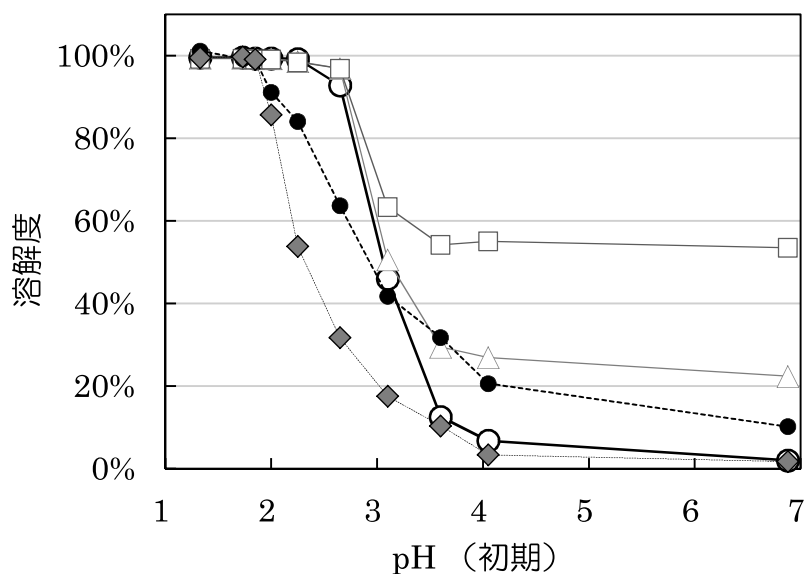


図 5 人工胃液希釈液の初期 pH に対する Ca 製剤の溶解度の変化

○ : Nano-CAL(n), △ : Nano-CAL(a), □ : Nano-CAL(b), ● : UNICAL, ◆ : CaCO₃

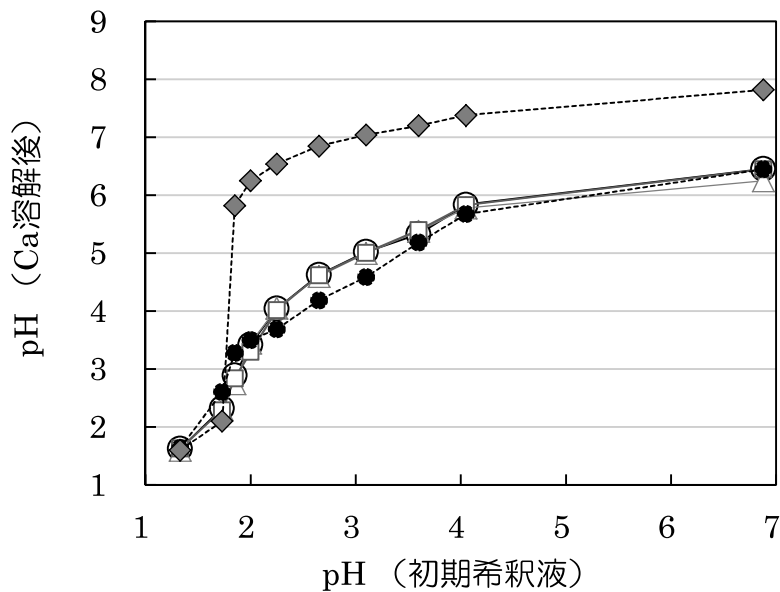


図6 人工胃液希釈液の初期 pH と Ca 製剤溶解後の pH

○ : Nano-CAL(n), △ : Nano-CAL(a), □ : Nano-CAL(b), ● : UNICAL, ◆ : CaCO₃

UNICAL と Nano-CAL(a, b, c)はいずれも同様の pH 変化を示しており、溶解度に差があっても溶解イオンが希釈液の pH に与える影響は大差がないことが分かる。対照的に CaCO₃ 剤は、初期 pH が 2 以上の場合は急激に pH が上昇しており、CaCO₃ 剤から遊離した Ca²⁺イオンが希釈液の pH を中和する作用をもたらしたことが分かる。したがって CaCO₃ 剤を摂取した場合は、飲食により胃液濃度が低下するだけでなく、遊離 Ca²⁺イオンにより胃液が中和されるため、溶解度が急激に低下することが分かる。

3. 3 酸性・中性・塩基性における Ca 製剤の溶解試験

食味の異なる Nano-CAL(n, a, b)を酸性水溶液（人工胃液 5%・天然水 95%）、中性水溶液（天然水）、塩基性水溶液（NaOH 70 mM/天然水）に添加した場合の溶解度を図 7 に示す。Ca の添加量を段階的に 0.2 mg/ml から 1.0 mg/ml まで変えて溶解度を測定した結果、酸性・中性・塩基性のいずれの水溶液に対しても苦味型の Nano-CAL(b)の溶解度がもっとも高く、次いで酸味型の Nano-CAL(a)となった。無味型の Nano-CAL(n)は溶解度が低く、中性水溶液に対し 0.67 mg/ml 添加した場合は大部分が沈殿および分散状態となった。また、いずれの味型の Nano-CAL も中性水溶液に対してもっとも溶解度が低く、塩基性水溶液に対しては溶解し易いことが分かった。

図 8 は同実験における Ca 製剤の添加量に対する各水溶液の pH の変化を示した。塩基性水溶液の場合にはどの Ca 製剤も pH 変化は乏しく、溶解成分の影響が小さいことが分かる。一方、Nano-CAL(a)を中性水溶液に溶解した場合は、添加量高めると pH が酸性側に大きくシフトしたが、Nano-CAL(n)と Nano-CAL(b)の pH 変化は小さかった。

酸性水溶液の場合は Ca 濃度に依存して一様に pH が上昇したが、溶解度と pH の偏差との間に相関性は認められず、Nano-CAL(b)は Nano-CAL(a)と Nano-CAL(n)よりもわずかに pH が高い値となった。

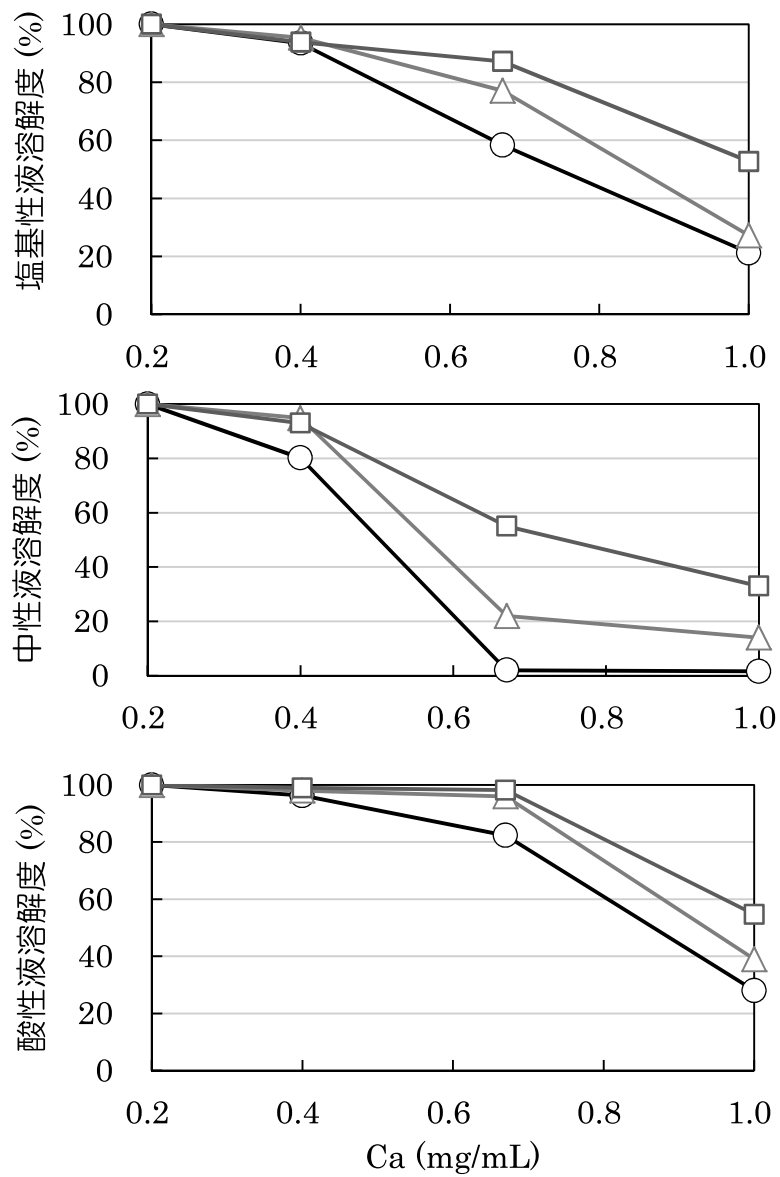


図7 酸性液・中性液・塩基性液のCa製剤添加量と溶解度の変化
○ : Nano-CAL(n), △ : Nano-CAL(a), □ : Nano-CAL(b)

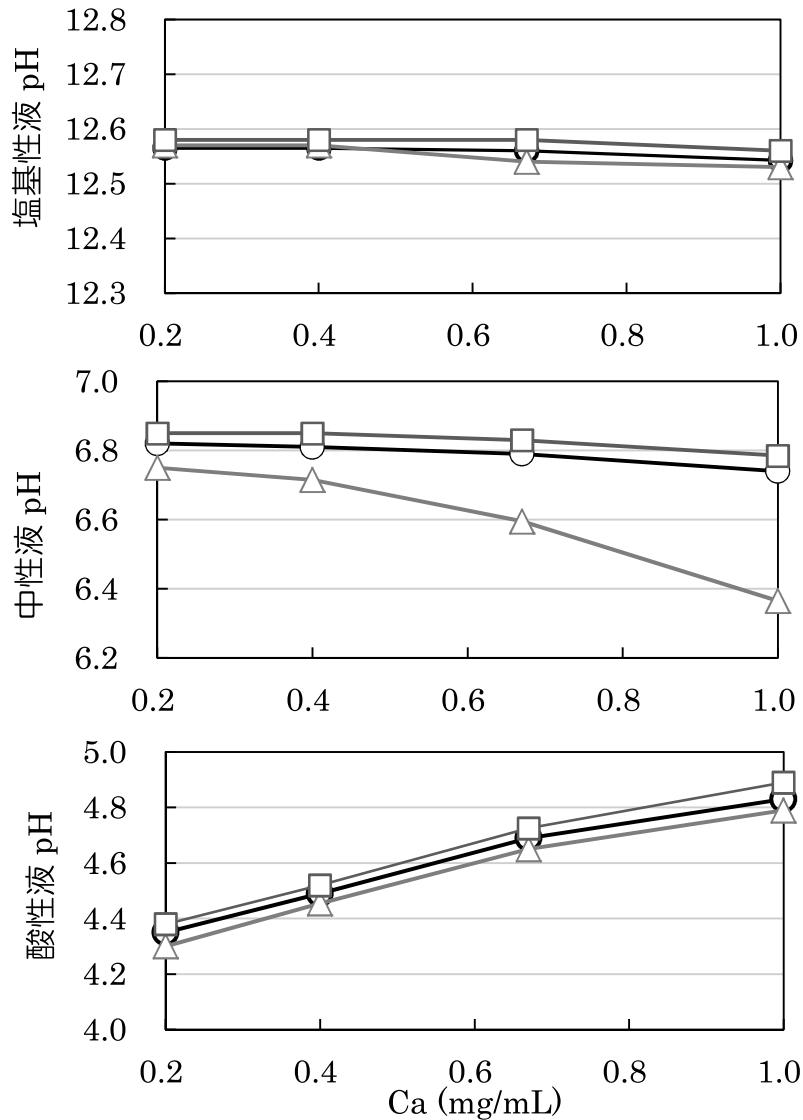


図8 酸性液・中性液・塩基性液のCa製剤添加量とpHの変化

○ : Nano-CAL(n), △ : Nano-CAL(a), □ : Nano-CAL(b)

3. 4 粒子径と粒度分布

図9は、実験に用いた5種類のCa製剤のSEM画像を示す。高倍率(10000倍)画像を解析すると、無味型Nano-CAL(n)、酸味型Nano-CAL(a)、苦味型Nano-CAL(b)のいずれも一次粒子の大きさは公称サイズである $0.4\ \mu\text{m}$ ~ $2\ \mu\text{m}$ ほどであり、従来品のUNICALや CaCO_3 剤よりも微細粒子であることが分かる。一方、低倍率で造粒構造を比較すると、Nano-CAL(n)は $5\ \mu\text{m}$ ~ $10\ \mu\text{m}$ の凝集塊を形成しているのに対し、Nano-CAL(a)とNano-CAL(b)の凝集塊はNano-CAL(n)よりも微細化していることが分かる。また、UNICALや CaCO_3 剤の場合は全体的に大粒子径の凝集体を形成しているのに対し、Nano-CAL品は大小さまざまな凝集体が混在していることが分かる。

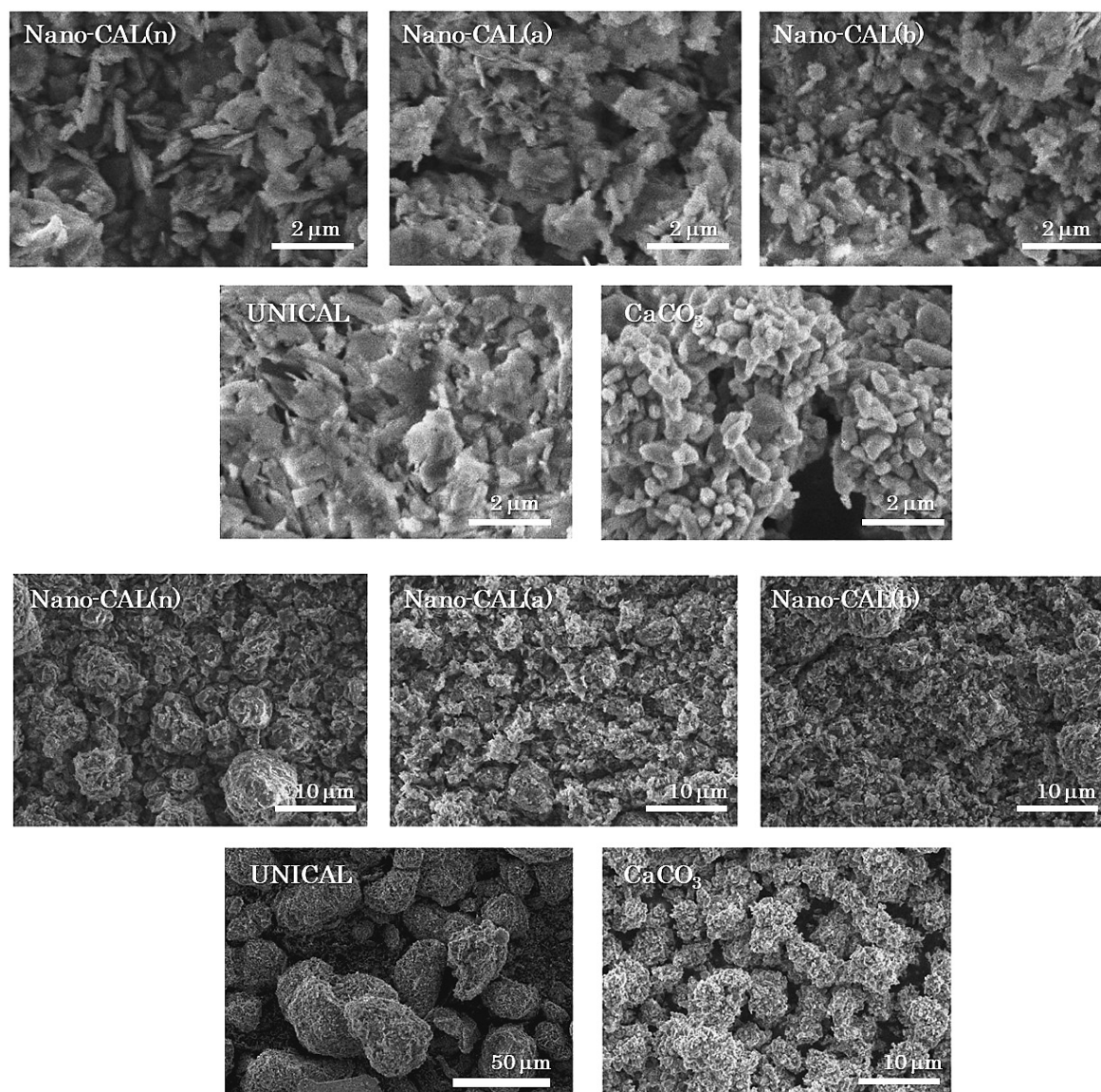


図9 Ca 製剤の走査型電子顕微鏡観察画像
(上二段：10000倍，下二段：2000倍，UNICAL：400倍)

図10は、各Ca製剤を蒸留水に分散し測定した粒子径分布を示す。中性域で溶解度が低いNano-CAL(n)の凝集体の平均粒子径は $8.6\ \mu\text{m}$ であり、一次粒子が比較的強く結合していることが分かる。一方、Nano-CAL(n)よりも溶解性が高いNano-CAL(a)は、 $1\ \mu\text{m}$ 未満の微細画分にもピークが観察され、平均粒子径は $1.9\ \mu\text{m}$ となった。蒸留水中で部分的に溶解が進んだ結果、一次粒子が遊離し分散したことが分かる。さらに高い溶解性のNano-CAL(b)は全体的に微分散しており、平均粒子径は $0.8\ \mu\text{m}$ となった。

一方、従来品のUNICALは平均粒子径が $60.6\ \mu\text{m}$ の単一ピークであり、蒸留水中で溶解性が低いことが分かる。これに対し、 CaCO_3 剤は $6\ \mu\text{m}$ 付近の主ピークに対し $1.1\ \mu\text{m}$ にも副ピークがあり部分溶解が進んだことが分かる。

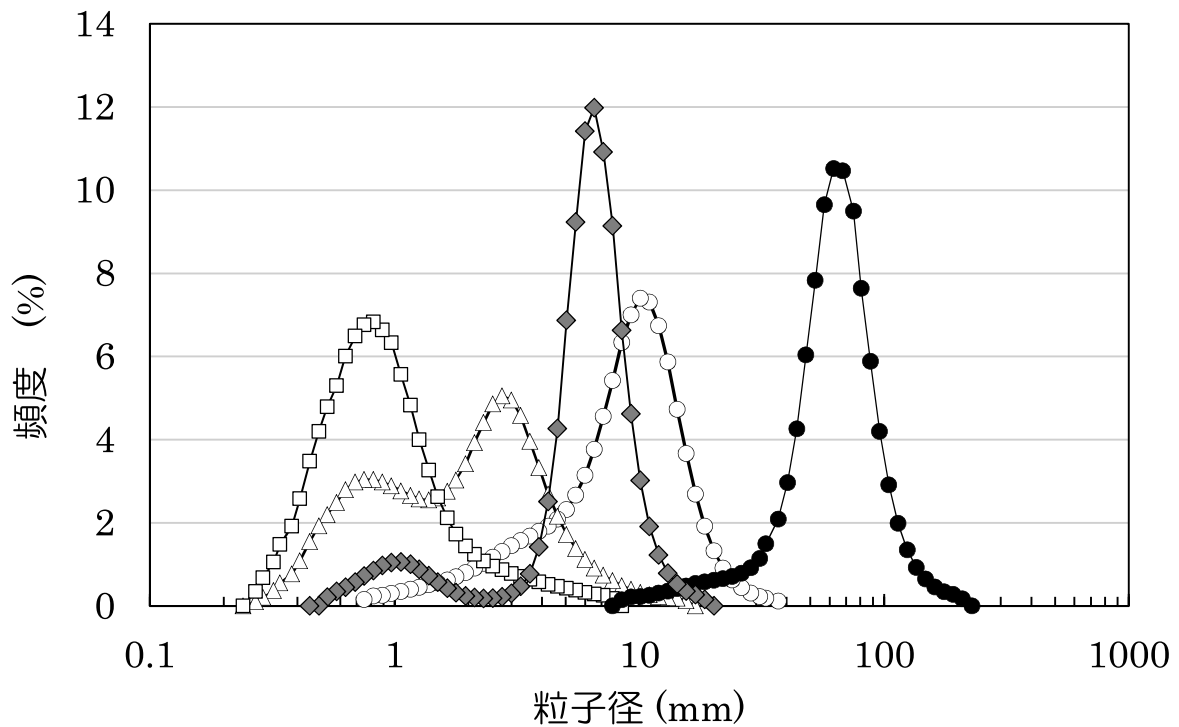


図 10 蒸留水に分散した Ca 製剤の粒度分布

○ : Nano-CAL(n), △ : Nano-CAL(a), □ : Nano-CAL(b), ● : UNICAL, ◆ : CaCO₃

3. 5 ポリグルタミン酸添加試験

図 11 は、ポリグルタミン酸 (PGA) 濃度を段階的に変えた天然水に、Nano-CAL(n)を溶解した場合の外観の変化を示す。PGA 無添加の場合は Nano-CAL(n)がほとんど溶解せず、試験管の底部に白い沈殿が堆積したが、PGA を 0.5 mg/ml 添加した場合は沈殿が消失し白濁した。また、PGA 濃度が高まると徐々に白濁の透明度が増し、2.5 mg/ml 以上の PGA 濃度ではほぼ全量溶解した。このように PGA は、Nano-CAL(n)の溶解度を高める効果があることが明らかとなった。

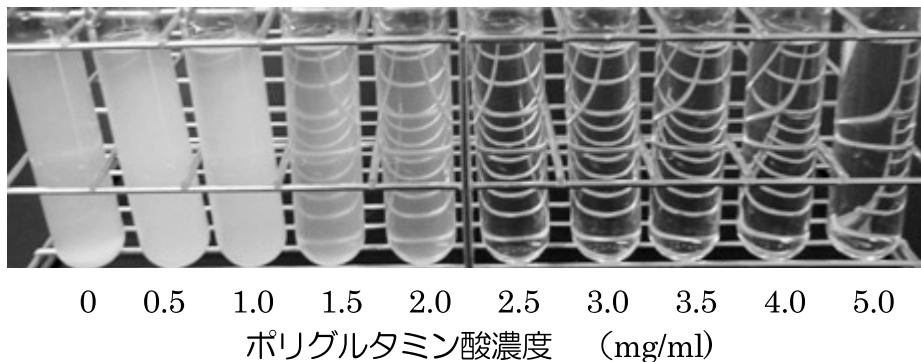


図 11 ポリグルタミン酸添加天然水に対する Nano-CAL(n)の溶解性

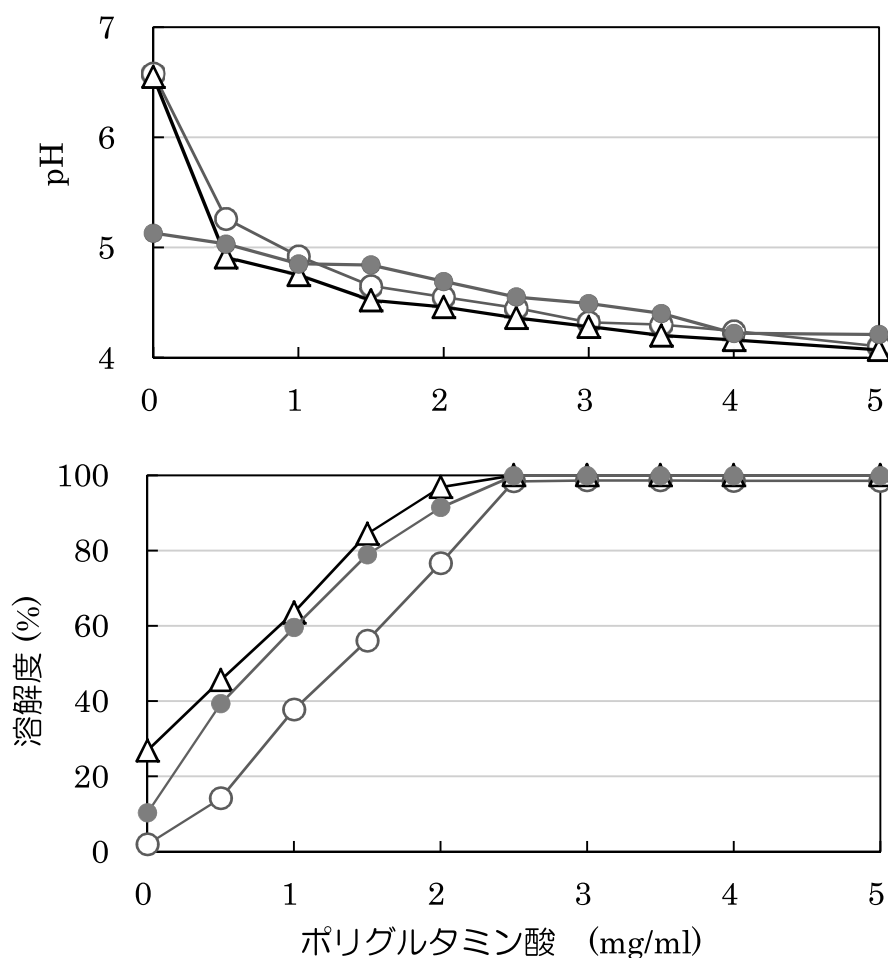


図 12 ポリグルタミン酸添加液における Ca 製剤の溶解度と pH の変化

○ : Nano-CAL(n)/天然水, △ : Nano-CAL(a)/天然水, ● : Nano-CAL(n)/人工胃液 5%希釈液

図 12 は、PGA 濃度を段階的に変えた天然水および人工胃液 5%希釈液に対する Nano-CAL(n)、天然水に対する Nano-CAL(a)の溶解度と pH の変化を示す。PGA の添加濃度に依存し pH が下降し Ca 製剤の溶解度が上昇した。PGA を添加した天然水に対する Nano-CAL(n)の溶解度は Nano-CAL(a)よりも低く、PGA 無添加の天然水への溶解性の差異と同様の結果となった。一方、Nano-CAL(n)を人工胃液 5%希釈液に溶解した場合は、天然水に分散した Nano-CAL(a)と同様の溶解度となった。以上の結果から、PGA を添加することで Nano-CAL(n)の溶解度が向上することが明らかとなった。

3. 6 Ca 製剤の粉砕溶解性試験

図 13 は、Ca 製剤を乳鉢と乳棒で摩砕した微粉砕品の分散液（人工胃液 5%希釈液）に、PGA を 2.0 mg/ml 添加した場合の濁度（OD）と pH の変化を摩砕時間に対して示す。Nano-CAL(n)を摩砕した微粉砕品の分散液は、摩砕時間に依存して OD が 710 から 425 まで徐々に低下した。一方、UNICAL を摩砕した場合は、摩砕時間に依存して OD が 218 から 610 へと高まった。Nano-CAL(n)は微粒子化が進んだことにより溶解度が高まったのに対し、粒子径が大きな UNICAL は摩砕により粒子径が低下したが、不溶性の粒子数が増えた結果 OD が上昇したことが分かる。

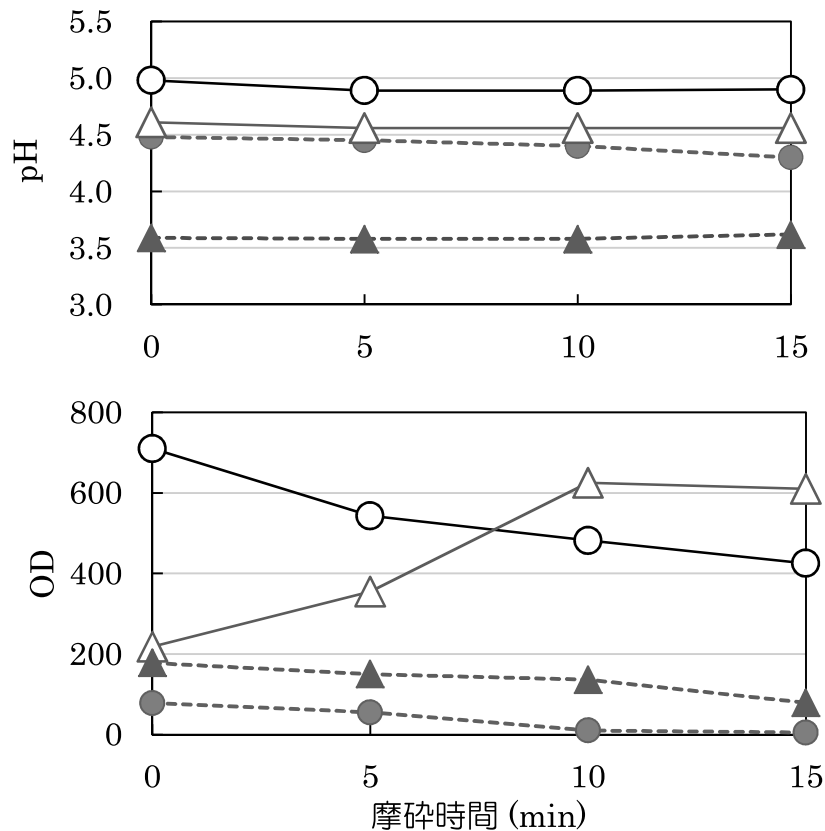


図 13 Ca 製剤の粉碎による濁度(OD)と pH の変化

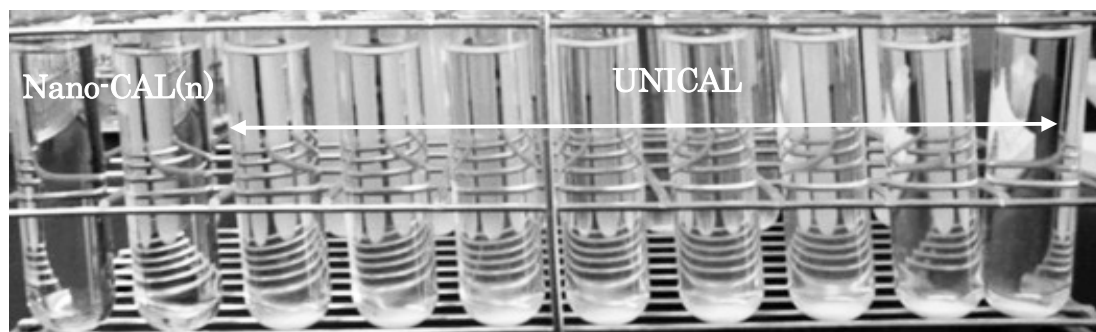
○ : Nano-CAL(n), △ : UNICAL, ● : Nano-CAL(n)+PGA, ▲ : UNICAL+PGA

次に、各分散液に PGA を 2 mg/ml 添加したところ、Nano-CAL(n)の未粉碎品の溶解度は OD が 78 に低下（溶解度 89%）したのに対し、15 min 粉碎品はほぼ全量が溶解した。一方、UNICAL の未粉碎品は OD が 178 に低下（溶解度 18%）したのに対し、15 min 粉碎品は OD が 610（溶解度 87%）となった。

溶解液の pH の変化は、Nano-CAL(n)が PGA 無添加の場合の 4.9 から PGA 添加後に 4.4 に変化したのに対し、UNICAL が 4.6 から 3.6 へと変化した。PGA の添加量は一定であり、それぞれ溶解度が高まっても pH の変動幅にはあまり変化がないことから、PGA は Ca 製剤から遊離した成分の溶解性を高めていることが分かる。

図 14 は、同実験における試料の外観を示す。Nano-CAL(n)の粉碎品は、PGA 無添加の場合は液全体が薄く白濁しているが、PGA を添加した場合は白濁が消え溶解したことが分かる。一方、UNICAL 試料の場合は、PGA 無添加の場合は摩砕時間に依存して分散性の微粒子が増えたため白濁度が増したが、一部は底部に沈殿している。そして、PGA を添加すると浮遊性の白濁粒子は消えたが、沈殿部はそのまま残存していることが分かる。すなわち、PGA は Ca 製剤から遊離した微細粒子の溶解性を高めているが、大粒子の溶解性にはあまり効果がないことが分かる。

PGA : 2 mg/ml



PGA: 無添加

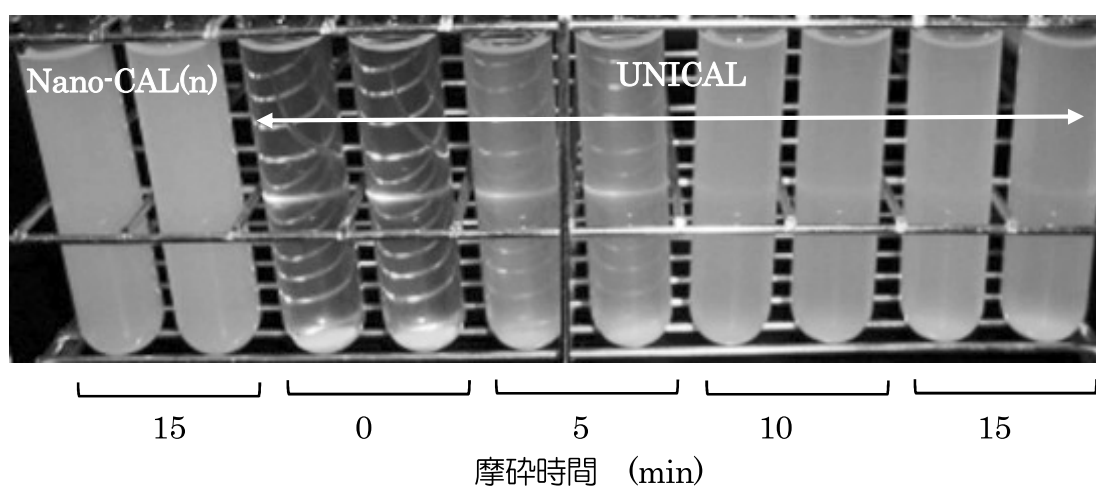


図 14 Nano-CAL(n)と UNICAL 粉砕品の分散液への PGA を 2 mg/ml 添加した場合と無添加による溶解性の比較



1.1 2.2 3.2 4.3

Ca 濃度 (mg/ml)

図 15 豆乳に Nano-CAL(n)を添加し 10 日後の外観

3. 7 豆乳への Ca 製剤添加試験

豆乳に Nano-CAL(n)を添加し混合攪拌したのち、10日間冷蔵保存した試験液の外観を図15に示す。Ca濃度が1.1 mg/mlの場合は比較的安定に分散性が保たれており、豆乳タンパク質が Nano-CAL(n)の分散補助剤として作用したことを示唆する。一方、配合量を2.2 mg/ml以上に濃度を高めると豆乳成分が凝集し分離していることが分かる。

4. 考察

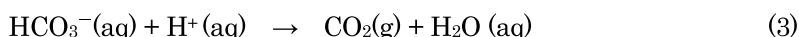
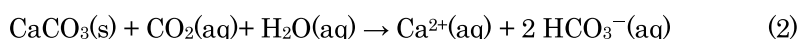
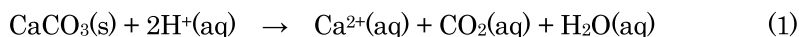
Ca製剤を飲食物に添加し摂取した場合は飲食物の水分により胃酸が希釈および中和されるため、胃内のCa溶解率が低下し小腸での吸収率も低下すると考えられている。したがって食品に添加し摂取するCa製剤の吸収性の評価には、飲用水で希釈および中和された中性域の胃液に対するイオン化率や溶解率が重要であると考えられる。そこで医薬品の錠剤や粉末の溶解試験に汎用されている人工胃液を用いて、人工胃液のpHや濃度を段階的に変えてCa補給剤の溶解率を比較する方法を検討した。

はじめにNaOH水溶液を添加し試験液の調製を試みたところ、人工胃液はpH緩衝作用が乏しいため中和当量を境に急激にpHが塩基性に変化し、段階的pH条件の調製が困難であることが判明した。

次に人工胃液を市販の天然水で希釈する方法を検討したところ、人工胃液の希釈率を段階的に変えることでpHを1.3から7.0の範囲で調節できることを見出し、溶解性試験液として用いた。実際のCa製剤の服用においても水道水を用いた飲食物や天然水の摂取により胃液が希釈されるため、人工胃液を天然水で希釈する方法は簡便で実用的な溶解性評価試験液の調製方法であると結論づけられる。

胃液の主成分は塩酸(HCl)、タンパク質分解酵素(ペプシン)、粘液および水分であり、空腹時の胃液量は50 ml以下と少量であるが、1回の食事で約500~700 ml分泌され、1日の分泌量は約1500~2500 ml、pHは1.0~1.5の酸性である⁽¹⁶⁾。これに対し1回の食事における水分の摂取量は1 L前後であるため、食中食後のCa補給剤の摂取を想定した溶解性試験には、人工胃液の希釈倍率を5%~50%の範囲で段階的に設定することが妥当であると考えられる。これらの結果に基づき調製した人工胃液希釈液を用いて各種Ca製剤の溶解性試験を行ったところ、CaCO₃製剤はクエン酸カルシウム製剤よりも溶解度が低く、溶解液のpHの変化も大きく異なることが判明した。

クエン酸カルシウム製剤を初期pHが6.3よりも低い希釈液に溶解すると試験液のpHが上昇したが、pH 6.4以上の中性液に対してはpHが下降した。一方、CaCO₃製剤を溶解すると、試験液のpHが大幅に上昇し中性となった。CaCO₃はpH4以下の酸性条件下では下記の反応によりほぼ全量溶解する。反応式(3)のpK_aは6.35である⁽¹⁷⁾。したがって、炭酸イオンはpH4以下ではほぼ全量がCO₂となり、溶液中に遊離したCa²⁺イオンが胃酸を中和する作用をもたらす。このため希釈液のpHが中性側に大きくシフトし溶解度が低下すると考察される。



一方、分子内に3つのカルボン酸基をもつクエン酸(HOOC)C(OH)(CH₂COOH)₂は三段階で解離する。pK_aはそれぞれpK_{a1} = 3.09, pK_{a2} = 4.75, pK_{a3} = 6.41と報告されており、中性から弱酸性にかけてカルボン酸陰イオン(R-COO⁻)が段階的にカルボン酸(R-COOH)へと変化する⁽¹⁹⁾(図16)。この三段階の解離平衡反応はpHの緩衝作用をもたらすため、クエン酸カルシウムが溶解してもpHが比較的安定に保たれることが分かる。

胃液が希釈された中性域においてクエン酸分子は 1 価のカルボン酸イオン R-COO⁻型であると推定される。したがって、無味型 Nano-CAL(n)は固形微粒子の表層に露出する R-COO⁻基に対する Ca²⁺のモル比がちょうど均衡し表面電荷が中和された結果、溶解度が低くなったと考察される。これに対し酸味型 Nano-CAL(a)は過剰の R-COO⁻が微粒子表面に露出し遊離 Ca イオンと結合し pH を下降する作用をもたらす結果、中性域における溶解度が高まると考察される。一方、苦味型 Nano-CAL(b)は、微粒子表層から遊離する Ca イオンが過剰となり、不足分の R-COO⁻イオンを補給するためにクエン酸カルシウム分子の溶解率が高まったと考察される。

以上のように、中性域でクエン酸カルシウム製剤の溶解度を高めるためには、クエン酸に対する Ca のモル比を過剰にすることが有効であると考えられる。だが、過剰な遊離 Ca イオンは苦味を生じるため、食品用途には重大な欠点となることが知られている。同様に酸味が強い場合も食品添加用途が限定されるだけでなく、過剰に遊離した Ca イオンはしばしばタンパク質の凝集作用をもたらす。

一例として豆乳は、大豆タンパク質やポリフェノールを含み、動物性食品に比べて低カロリーで基礎代謝を活発にする機能やダイエットに効果があると期待されており、血清コレステロールの低下作用、血小板の凝集性の抑制作用など、全身の血流改善に役立つといわれている。だが、食品分析表によると牛乳 (Ca 濃度: 1.1 mg/ml) よりも Ca 含有率が低い (Ca 濃度: 0.2 mg/ml) ため Ca 補給剤の配合が期待される。

ところが、Ca 補給剤を過剰に豆乳に添加すると図 15 に示すように Ca 補給剤が凝固剤として作用することが知られている。同様に各種食品に Ca 補給剤を添加する場合も、酸味や苦味の原因である遊離イオンが食品中のタンパク質やミネラルと反応し、食味や粘弾性や均一分散性など食品の味覚や咀嚼性や流動性に関わる物性に影響を与え、嗜好性を低下することが懸念される。

このように Ca 補給剤として各種食品に添加するためには、食品成分と無反応でありながら均一分散すると共に、中性溶液でも高い溶解性が求められる。そこで、各種ミネラルの吸収性を高める効果が注目されているポリグルタミン酸 PGA を配合した場合の Ca 製剤の溶解性を検証した。ポリグルタミン酸は、EDTA など同様のポリカルボン酸のキレート作用により、溶液中に分散した Ca イオンの再凝集や結合反応を防ぐことで溶解性や吸収性を高めると報告されている⁽²⁰⁾。Nano-CAL(n)に PGA を添加したところ、PGA 無添加の場合には部分溶解により分散白濁した Ca 製剤が、PGA の添加量高めるとほぼ全量溶解し透明液となった。

一方、粒子径が大きいため溶解度が低い UNICAL を乳鉢で摩砕し PGA の添加効果を調べたところ、PGA 無添加の場合は摩砕すればするほど分散微粒子数が増加することで濁度が上昇したが、PGA を添加すると浮遊状の微粒子が溶解し透明液となり、沈殿部には大きな変化は見られなかった。

同様に Nano-CAL(n)を摩砕した場合には、Nano-CAL(a)と同水準まで溶解度が高まった。すなわち、Ca 製剤は微細粒子化すればするほど溶解度が高まり、遊離した Ca イオンをキレート剤により再凝集や結合反応を抑えることで Ca 製剤の溶解性と吸収率を高められることが明らかとなった。

PGA は日本の伝統食「納豆」のネバ (糸引き) の主成分であり、無味無臭に加工された PGA が既に食品添加剤として多方面で利用されている。一方、Ca 補給剤に PGA を添加する場合には、上述のように過剰のカルボン酸イオンが食品成分と反応し味覚や使用感に影響を与えることも懸念される。Ca 製剤の溶解度を高めるために、Ca イオンの分散性を高める配合剤の添加が各種食品に与える影響を解析し、最適な配合処方や配合方法を検討することが必要である。

本実験で用いた味覚が異なる三種類の Nano-CAL 製剤は、天然のホタテ貝殻を焼成処理し調製した CaO を水に溶解し、pH を指標としてクエン酸を中和当量加えた混合スラリーを原料として微粒子に加工した製剤を試験に用いた。したがって、CaO が十分に溶解しないまま中和した場合は Ca を過剰に含む粉体が生成し、逆にクエン酸の反応性が低いと過剰に供給され酸味のある粉体を生成すると考察される。その結果、微粒子内部にイオン基が偏在し表層のカルボン酸イオン基と Ca イオンのバランスが偏り酸味や苦味を呈したと考察される。

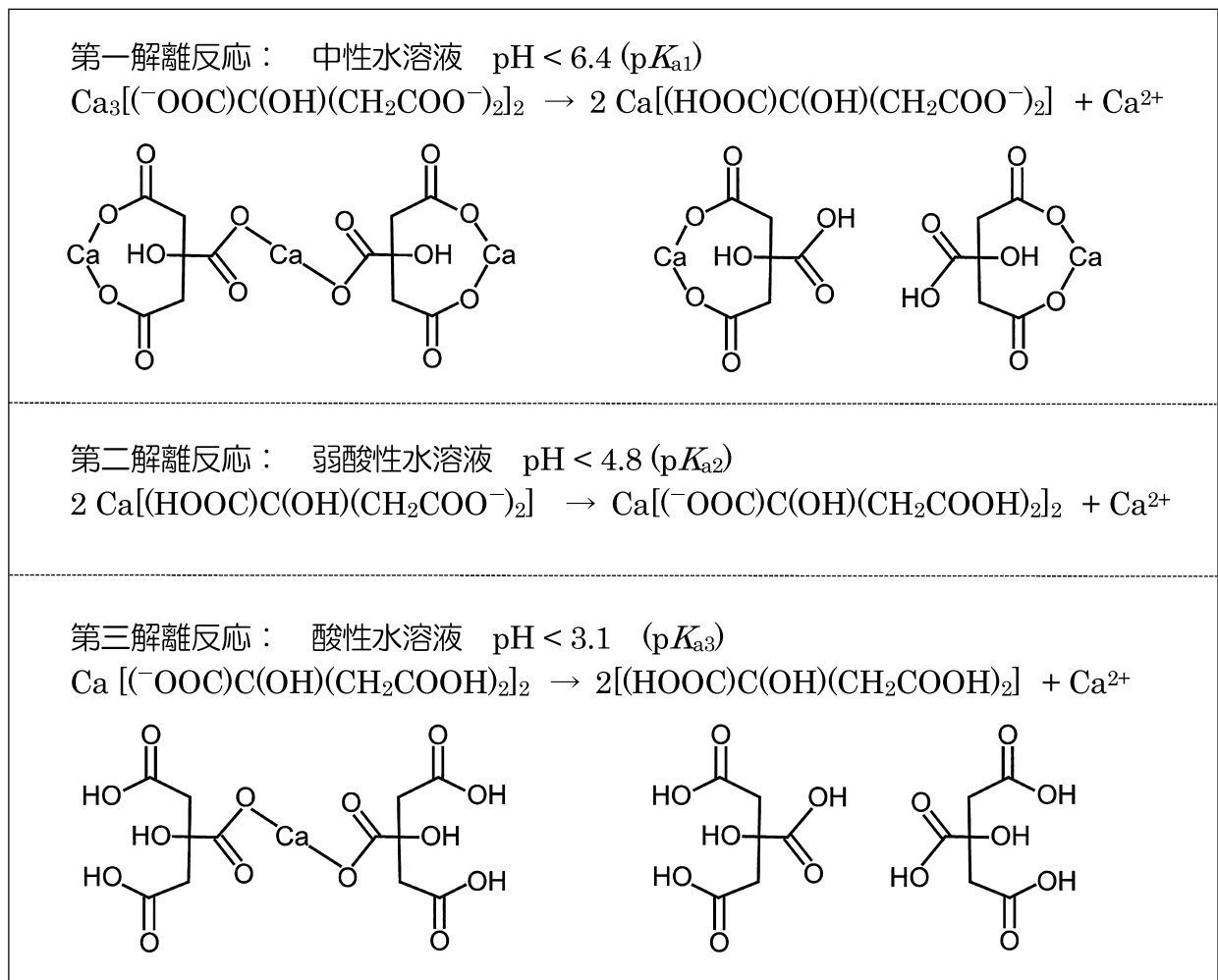


図 16 クエン酸カルシウム水溶液 pH に依存した三段階解離反応の概要（一部構造を簡略化）

生成粉体の酸味や苦味などの官能評価は、経験や味覚感度の異なる個人間でバラつきがあるため品質管理に用いることは困難であったが、今回の結果からカルボン酸や Ca の偏在性が溶解度や pH の変化に影響を及ぼすことが明らかとなり、再現性のよい品質管理法としても有効であることが判明した。

本研究成果は、ホタテ貝殻に限らず各種天然原料から合成するミネラル補給剤の溶解度や吸収性の評価方法としても有効であると期待される。

5. 謝辞

粒子径分布の測定と SEM 観察は、化粧品粉体メーカーである株式会社ヤマグチマイカ（愛知県豊川市）のご厚意により同社の装置を用いて実施しました。測定にご協力頂いた山口仁司氏、山口典久氏に深謝いたします。

6. 参考文献

- (1) Fleet, J. C. (2017) The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 453, 36–45.
- (2) Khammissa, R.A.G., Fourie, J., Motswaledi, M.H., Ballyram, R., Lemmer, J. and Feller, L. (2018) The biological activities of vitamin D and its receptor in relation to calcium and bone homeostasis, cancer, immune and cardiovascular systems, skin biology, and oral health. *Biomed. Res. Int.*, 9276380.
- (3) James, L. (2013) 低カルシウム血症, MSD Manual 家庭版
- (4) 国民健康・栄養調査 (平成 29 年), 栄養素・食品群別摂取量に関する状況, 厚生労働省
- (5) 日本人の食事摂取基準 (2015 年版), 厚生労働省
- (6) 鈴木高広 (2014) 化粧品の材料設計～基礎から応用まで-27, 美白肌の記憶色とメイクの理想色, *化学装置* 56 (1), 74-79.
- (7) Barboza, G. D., Guizzard, S., and Talamoni, N. T. (2015) Molecular aspects of intestinal calcium absorption, *World J Gastroenterol.*, 21 (23), 7142–7154.
- (8) 安江任, 荒井康夫 (1995) 粒子設計によるカルシウム化合物の新展開, *資源・素材学会誌* 111 (7), 439-448.
- (9) 特開平 6-197736
- (10) Beggs, M. R. and Alexander, R. T. (2017) Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development, *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 242 (8), 840–849.
- (11) Erba, D., Ciappellano, S. and Testolin, G. (2002) Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats, *Nutrition*, 18 (9), 743-746.
- (12) 原博 (2011) 消化管の中で生理作用を発揮する食品成分に関する研究, *日本栄養・食料学誌* 64 (6), 367-376.
- (13) Miyazato, S., Nakagawa, C., Kishimoto, Y., Tagami, H. and Hara, H. (2010) Promotive effects of resistant maltodextrin on apparent absorption of calcium, magnesium, iron and zinc in rats, *Eur. J. Nutr.*, 49, 165-171.
- (14) 有田正秀, 本村明, 櫻井俊弘, 松井敏幸, 八尾恒良, 岡田光男 (1991) 夜間胃液検査と胃内 pH-monitoring との相関, *日本消化器病学会雑誌* 88 (4), 1145.
- (15) 白鳥敬子, 渡辺伸一郎, 丸山正隆, 大田由己子, 黒川きみえ, 竹内正 (1983) 食後の血中 secretin レベルと胃内 pH, *日本消化器病学会雑誌* 80 (2), 156-159.
- (16) 第一薬品工業株式会社ホームページ, 健康情報 2016.11.29 版
- (17) 宗森信 (1993) わが国における酸性雨の分析データの解析, *環境技術* 22 (10), 590-598.
- (18) Pak, C. Y., Harvey, J. A. and Hsu, M. C. (1987) Enhanced calcium bioavailability from a solubilized form of calcium citrate, *Clinical Endocrinology Metabolism*, 65 (4) 801-805.
- (19) Tanimoto, H., Mori, M., Motoki, M., Torii, K., Kadowaki, M. and Noguchi, T. (2001) Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 65 (3) 516-521.
- (20) Tanimoto, H., Fox, T., Eagles, J., Satoh, H., Nozawa, H., Okiyama, A., Morinaga, Y. and Fairweather-Tait, S. J. (2007) Acute effect of poly- γ -glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women, *J. Am. Coll. Nutr.* 26 (6), 645-649.

英文抄録

Solubility evaluation of high absorbent calcium food made from scallop shell by artificial gastric juice test

Takahiro Suzuki¹, Masaru Sakamoto¹, Nobuhiko Tabata², and Yoshinari Okino²

Calcium, which is a main component of hard tissues such as bones and teeth, is an essential mineral having various physiological functions in blood, muscles, nerves, and the like. Japanese people tend to have a shortage of calcium intake, and various calcium supplements and calcium preparations have been commercialized, but have problems such as low solubility and absorption in the digestive tract. In order to increase the solubility and absorption of calcium supplements and to expand their use as foods, the use of fine-particle calcium citrate preparation (Nano-CAL) made from scallop shells was used to improve the solubility and dispersibility. We investigated and modified the solubility test method, and evaluated its functionality as a calcium supplement.

First, the solubility and pH changes of various Ca preparations (calcium citrate powder, calcium carbonate) were analyzed using an aqueous solution of artificial gastric juice diluted stepwise with natural mineral water. As a result, it was found that fine particle calcium citrate has higher dispersibility and solubility than large particle calcium citrate and calcium carbonate. It was also found that bitter type Nano-CAL (b) was the highest solubility, followed by the solubilities of the sour type Nano-CAL (a), and the solubility of the tasteless Nano-CAL (n) was low. These results suggest that the unbalanced contents or heterogeneous distribution of Ca and carboxylate ions in the particles increases the solubility.

Therefore, we examined a method to increase the solubility of Nano-CAL (n). It was found that the dispersibility increased by grinding in a mortar, and that the addition of polyglutamic acid increased the solubility. In addition, when the Nano-CAL (n) agent was added to soymilk at a supersaturated concentration, the dispersibility and uniformity of the soymilk component were maintained even when the Ca concentration was increased to a concentration equivalent to milk (1.2 mg / ml), which suggested that soymilk protein functions as a Ca dispersant.

Key words: calcium food, artificial gastric juice, calcium citrate, scallop shell, solubility

Received 20 January 2020, Accepted 25 February 2020.

1. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Universal Calcium Food Co., Ltd., Shibuya 3-chome TR Building 9F, 3-8-11 Shibuya, Shibuya-ku, Tokyo 150-0002, Japan