

総括研究報告書

**安全な高吸収化機能性食品の開発支援を目指した、  
安全性評価のための指標の抽出と標準化に向けた研究**

研究代表者 長野一也 大阪大学大学院薬学研究科・准教授

**研究要旨**

本研究では、機能性食品の中でも、リスクに直結する可能性がある「吸収性を改善(曝露量が増加)した機能性食品」に着目し、独自の「物性-動態-毒性の連関解析手法」を適用することで、安全な高吸収化機能性食品を開発する際の指標（動態学的因子など）の抽出を目的とする。具体的には、独自処方の高吸収性非晶質クルクミン（CUR）を開発する中で、吸収特性(水溶性/消失速度など)の異なる製剤を多数有しているため、それらの物性と動態、毒性を比較することで、高吸収化製剤の安全性を評価するうえでの指標を抽出し、開発する際の安全性評価の標準化・ガイドライン策定に資する知見の収集が期待される。

本目的を達成するために、1年目では、各項目について解析するためのアッセイ系の足がかりが構築できた。そこで、本年度（2年目）では、以下のように、アッセイ系を最適化するとともに、実際に、様々な非晶質製剤を比較することで、品質に関わる知見や評価指標を抽出できた。今後は、さらに、安全性評価のための指標の抽出を図るとともに、安全性を担保するための対応策を提示する予定である。

- ① 「CUR同士の相関ピークの消失」を指標に、非晶質性の質を担保しうることを提示した。
- ② PGFEの配合によって固化しやすくなるものの、水溶性には影響しないことを提示するとともに、高分子ポリマーや分散剤自体の吸湿性に違いがあり、固化の要因になりうることを示した。
- ③ 高分子ポリマーの使い分けで、吸収プロファイル（速効型/徐放型）を制御しうることを提示した。
- ④ 組織分布したCURは、24時間以内に代謝/排泄され、蓄積性が少なく、CURは高吸収化製剤としても安全性が高いことを提示した。
- ⑤ CURの代謝物として、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合/硫酸抱合体が見出され、特に、グルクロン酸抱合体が多くを占めていることを見出した。
- ⑥ CURの毒性評価としては、肝臓に着目した系が適しうることが示唆された。

**A. 研究目的**

近年の健康に対する意識の高まりも相まって、国が個別に有用性を審査/承認する「特定保健用食品(特保)」の市場は6,000億円をこえ、一大市場を形成している。また、特保の長い審査期間と多大な費用も考慮され、事業者の責任のもとで機能性表示を可能

にした「機能性表示食品」制度が昨年度から始まり、この1年間に、300以上の機能性食品が申請されている。このような機能性食品は、有用性が注目されがちであるものの、塩や砂糖であってもゼロリスクは存在しえないことを考慮しなければならない。ただ、それでも食品においては、ゼロリスクが求められる

### 別添3

風潮があることも事実であり、エコナ問題を繰り返させないためにも、「安全性の確保」は重要である。特に、個別審査のない機能性表示食品では既に、含量不足や成分の試験法さえ明示されていないことも指摘されており、その安全性確保は僅々の課題となっている。

このような機能性食品の中でも、安全性確保にとって重要なリスク(ハザードと生体曝露の積算)の観点から考えると、「吸収性の改善を謳い、成分が生体に多く入る食品」は、慎重に開発する必要がある。しかし、世間では、クルクミンなどのように、吸収性の低い原末の安全性が実績(食経験)として強調され、あたかも吸収性さえ改善すれば、安全で有用な機能性食品が開発できるといった主張も散見される。また、特保の申請では、この「食経験」が安全性の重要な因子であるものの、上述のように、そのままではまるとも考えにくい。したがって、本邦の機能性食品が、今後も国民の健康増進に活用されるためにも、高吸収化体だからこそその安全性評価が必要である。

そこで本研究では、独自処方で溶解性・吸収性を大きく改善させた非晶質クルクミン【特願2015-201582】をモデルに、市販されている高吸収性クルクミンや、様々な特性(水溶性や消失速度の違いなど)を有した非晶質製剤と比較しながら、物性や動態情報を基盤とした安全性情報を収集することで、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標(動態学的因子や分子間相互作用など)の抽出を目的とし、開発する際の安全性評価の標準化・ガイドライン策定を目指す。

特保については、1993年に低リンミルクLPKが承認されて以来、その市場は右肩あがりに拡大していった(1997年からの10年間で市場は5倍に拡大)。しかし、2009年のエコナ問題による安全性への懸念から、6,800億円もの市場が、5,500億円(20%減)まで落ち込み、しばらく横ばい傾向が続くこととな

った。このように、日常、口にする食品の安全性への懸念は、大きな社会問題となることが多い。このような観点から考えると、特保に比べ、機能性表示食品は、短期間・低コストといった利点も多いけれども、供される食品の品質などは事業者に依存するところが多いため、第二のエコナ問題がおきないか、懸念も指摘されている。特に、高吸収化体は、従前の原末などが吸収されなかったから安全だっただけの可能性があり、吸収されるようになると、食経験があっても、予期せぬ生体影響の発現が考えられる。したがって、食品の有用性を求めると同時に、高品質で安全な製剤を開発することが重要であり、その方策や指標が必要とされている。

その点、本研究成果は、

- ① 安全で有用な高吸収性クルクミンを開発することが可能になるばかりか、
- ② これらの研究を通じて、高吸収化体の開発のモデルケースになることも期待される。
- ③ さらに、様々な吸収特性を有した製剤や市販品との比較解析によって、高吸収化体の安全性を評価するうえでの指標の抽出も期待される。
- ④ 最終的には、高吸収化機能性食品を開発する際の安全性評価の標準化・ガイドライン策定を通じ、厚生労働行政に貢献しうる研究といえる。

**B. 研究方法****<sup>1</sup>H-NMR による分子間相互作用解析**

1 mg CUR/mL (D<sub>2</sub>O) を以下の条件で <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance ( <sup>1</sup>H-NMR )、 Nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY) 解析に用いた。

**<sup>1</sup>H-NMR 測定条件**

使用機器	: INOVA600 (Agilent, Santa Clara, CA)
温度	: 37°C
NOESY mixing time	: 100 ms
観測幅	: 8000Hz (13.3ppm)
観測中心周波数	: 599.83 MHz (4.67 ppm)
測定ポイント数	: 512* x 128* (複素ポイント)
積算	: 32 回
繰り返し時間	: 3 秒

**加速試験による製剤の安定性の評価と比較**

下記の条件で製剤を保管し、保存安定性を評価した。

[ 未虐待群 ]

温度: 25°C

容器: アルミ蒸着袋

[ 虐待群 ]

温度: 40°C

湿度: 75%RH

容器: アルミ蒸着袋、又は低密度ポリエチレン袋

**溶出試験**

溶出試験機 (宮本理研工業株式会社製、Osaka、Japan) を用いて行った。丸底フラスコに薬局方第二液 (\*1) を 900 mL 投入し、37°C に調整した。パドルを 50 rpm にて攪拌下、未虐待・虐待試料を CUR として 10 mg/100 mL 量添加した。30、60、

120、360 分後にシリンジにてサンプリングし、0.2 μm メンブランフィルターにてろ過した。ろ液 5 mL とメタノール 5 ml を混合し、混合液を 0.45 μm メンブランフィルターにてろ過後、ろ液を HPLC (high performance liquid chromatography) 測定に用いた。

(\*1) 第二液: 0.2 mol/L リン酸二水素カリウム溶液 250 mL に 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 118 mL 及び水を加えて 1000 mL とした (pH6.8)。

**HPLC 測定条件**

カラム	: L-Column ODS 4.6×250 mm
カラム温度	: 40°C
移動相	: 0.1%リン酸含有 50%ACN 水溶液
流速	: 1.0 mL/min
注入量	: 10 μL
検出波長	: 420 nm

**吸収性評価**

Sprague-Dawley rat (雌性) は、日本エスエルシ株式会社 (Shizuoka、Japan) より購入し、7 週齢にて実験を開始した。実験の前日には絶食させた。100 mg CUR/kg (超純水) で経口投与し、イソフルラン麻酔下で経時的に (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間) ヘパリン (500 units/mL) 処理したシリンジで採血した。回収した血液は、3,000 x g, 15 分, 4°C で遠心した後、血漿を回収した。血漿 (25 μL) に 10 μL 酢酸緩衝液 (pH 4)、内部標準として 200 ng/mL エモジン溶液を 50 μL、除蛋白のため、250 μL アセトニトリルを加え、ボルテックス後 10,000 x g, 5 分, 22°C で遠心した。上清を窒素乾固させ、200 μL メタノールで再溶解後 LC-MS/MS の測定に用いた。

LC-MS/MS には、Waters Acquity UPLC (Waters,

### 別添 3

Milford, MA) と Waters Quattro Premier XE (Waters) が連結した装置を使用した。サンプルは全て 80%メタノールで再溶解し、50%アセトニトリル/0.1%ギ酸水で平衡化を行った後、注入した。グラジエント条件は以下の通りに行った。(B アセトニトリル initial : 50%, 4 min : 95%, 7 min : 95 min, 7.1 min : 50%, 10 min : 50%)

#### LC-MS/MS 測定条件

項目	設定値
L C	
カラム	C18 カラム Waters (1.7 $\mu$ m, 2.1 x 50 mm)
移動相	A 0.1%ギ酸水 B ACN
流速	0.3 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 $\mu$ L
検出波長	420 nm
M S	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法
イオンモード	ポジティブモード
脱溶媒部温度	150°C
ヒートブロック	120°C
モニターイオン	CUR : 369.17 > 176.9 エモジン : 269.01 > 244.9

#### 自由飲水によるCURの組織分布解析

非晶質 CUR、市販品のいずれも 0.1%CUR となる様に CUR 溶液を作製し、飲水ボトルより 3 ヶ月摂取させた。3 ヶ月自由飲水後、24 時間水に変えて CUR の摂取を中断させた。脱血/解剖し、心臓、肺、脾臓、生殖器、脳、腎臓、肝臓を回収し、各臓器中の CUR 量を LC-MS/MS にて定量した。

#### 血漿中 CUR 由来代謝物の網羅的な解析

非晶質 CUR と水 (Control) をラットに単回強制経

口投与し、その 1 時間後に血漿を採取した。LC-MS/MS で解析するため、カラムを 0.1%ギ酸水で平衡化した後、各試料を注入した。グラジエント条件は以下の通りに行った。(B アセトニトリル initial : 0 %, 8 min : 95%, 11 min : 95 min, 11.1 min : 0%, 14 min : 0%)

#### LC-MS 測定条件

項目	設定値
L C	
カラム	C18 カラム Waters (1.7 $\mu$ m, 2.1 x 50 mm)
移動相	A 0.1%ギ酸水 B ACN
流速	0.3 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 $\mu$ L
検出波長	420 nm
M S precursor ion scan モード	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法
イオンモード	ネガティブモード
脱溶媒部温度	350°C
ヒートブロック	120°C
モニターイオン	Parents of 134.0 $m/z$ 150 ~ 700
コーン電圧	35 V
コリジョンエネルギー	25 V

#### 末梢血中 CUR 未変化体/グルクロン酸抱合体評価

非晶質 CUR を ICR マウスに経口投与 (100 mg CUR/kg) し、末梢血を採血した。末梢血中の CUR 未変化体とグルクロン酸抱合体は、以下の条件で LC-MS/MS にて定量した。尚、未変化体の定量条件は、吸収性評価を参照。

### 別添 3

項目	設定値
LC	
カラム	C18 カラム Waters (1.7 $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm)
移動相	A 0.1%ギ酸水 B ACN
流速	0.3 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	5 $\mu\text{L}$
検出波長	420 nm
MS	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法
イオンモード	ポジティブモード
脱溶媒部温度	350°C
ヒートブロック	120°C
モニターイオン	CUR : 369.17 > 176.9 CUR グルクロニド : 545.45 > 117.00

【病理解析】 大脳・小脳・肺・腎臓・脾臓・胃・腸・子宮・卵巣・肝臓を回収・固定した。その後、パラフィンで包埋し、ミクロトームにて 3~4  $\mu\text{m}$  厚の切片とした。それらを HE 染色し、病理解析した。所見は、アプライドメディカルリサーチ株式会社に委託した。

### 非晶質 CUR の 90 日間連続投与試験

雌性 BALB/c マウス (6 週齢) をランダムに 9、10 匹ずつ 3 つのグループに分けた。Non-treat 群には水を、Control 群 (PVP+PGFE)、非晶質 CUR 群には 10 mg/kg でそれぞれ 90 日間連日強制経口投与させた。投与開始から 91 日目に解剖し、各種臓器と血漿を採取したうえで、以下の解析に供した。

【体重・臓器重量】 体重と、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓などの重量を測定した。

【血球検査】 血球細胞数およびその他の血液学的パラメータは、採取したマウスの全血を用いて、多項目自動血球分析装置 XT-2000i (Sysmex, Hyogo, Japan) により測定した。

【生化学検査】 血漿中 AST、ALT、BUN、LAP 濃度は生化学自動分析装置 (Fuji DRI-CHEM 4000V, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

## C. 研究結果

### C-1. 分子間相互作用の解析と指標の抽出

下記のマイルストーン（MS）において、本年度は、物性の中でも、「分子間相互作用」の観点から、評価系の構築と、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標の抽出を図った。

#### **MS1 :様々な非晶質体と市販品の「分子間相互作用」を比較し、品質/毒性との相関を明らかにする**

本マイルストーンでは、物性の中でも、「分子間相互作用」の観点から、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標の抽出を図っている。

昨年度（1年目）は、製剤の水溶性に、分子間相互作用が関連し、その品質や特性は、<sup>1</sup>H-NMRによる半値幅や、IRスペクトルの波形分離後の結晶性クルクミン[CUR]（1510 cm<sup>-1</sup>のピーク）の残存性で評価可能なことを示した。しかしながら、本検討のみでは、CUR・ポリビニルピロリドン[PVP：高分子ポリマー]・ポリグリセリン脂肪酸エステル[PGFE：界面活性剤]の具体的な相互作用点や吸収性向上の作用機序との関連性について明らかにすることは困難である。

そこで本年度（2年目）は、空間的に近距離にあるプロトン核同士の相関が検出可能な2次元<sup>1</sup>H-NMR：NOESYを活用し、各成分同士が構築する分子間相互作用構造体モデルを構築することで、品質/毒性に関連するパラメーターを抽出し、製剤的安定性との相関を図った。

まず、水溶性の低い既存製剤（CUR/PVP）と水溶性の高い独自製剤（CUR/PVP/PGFE）をNOESYで比較解析した。その結果、①図2の青枠内では、CURとPVPの相関ピークが観測され、いずれの製剤もCURはPVPと相互作用していることが示された。また、②独自製剤は、既存製剤では検出されていない赤枠内のピークが検出されており、CURはPVPだけでなく、PGFEとも相互作用していることが示唆され

た。さらに、③興味深いことに、水溶性の高い独自製剤ではCUR同士の相関ピークがほとんど消失しており、CUR同士の相互作用が減少していることが示された。

そこで、CUR同士の相互作用の減少が、PGFEの影響によるものかを検証するため、PGFEの配合量とCUR同士の相互作用との関連を解析した。その結果、PGFEの配合量依存的な水溶性向上に伴い、CUR-CUR相互作用は減少することが示された。

これらから、CURの結晶化に貢献しているベンゼン環同士のπ-πスタッキングなどのCUR-CUR相互作用を、PGFEが減少させることで非晶質性を維持し、水溶性向上に寄与していることが示唆された。

また、本結果と製剤安定性の結果から、PGFEの配合で水溶性は向上するものの、安定性は低下し、固化しやすくなった。そのため、品質担保の観点からは、①水溶性と安定性のバランスで「分散剤：PGFEの配合量」を調整するか、②「包装（アルミ蒸着袋など）」を考慮する必要性が提示された。

2年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**製剤の「水溶性」には、「分子間相互作用」が関連し、その品質や特性は、1)<sup>1</sup>H-NMRによる半値幅や、2)IRスペクトルの波形分離後の結晶性CUR(1510 cm<sup>-1</sup>のピーク)の残存性、3)NOESYによるCUR同士の相関ピークの消失で評価可能なことが示唆。**

**上記を踏まえ、高水溶性非晶質製剤の品質担保の観点では、①水溶性と製剤的安定性のバランスで分散剤の配合量などの処方を考えるか、②アルミ蒸着袋のように、包装を考慮する必要性が提示。**

以上の解析から、PGFEを配合することで、非晶質性が向上し、水溶性が高まることが示された。その一方で、本製剤の特徴は、高い水溶性に加え、それが長時間維持される点にある（非晶質製剤の多くは、一時的に水溶性が高まるものの、短時間で再結晶化

し、水溶性は低下)。そこで今後は、非晶質性の維持に、CURの拡散速度が関連していることを仮説(本製剤のCURの拡散速度は遅く、再接触頻度が低いために安定と予測)し、品質担保にとって重要なパラメーターの抽出を目指す。

## C-2. 製剤的安定性の解析と指標の抽出

下記の MS において、本年度は、物性の中でも、「製剤的安定性」の観点から、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標や対応策の抽出を図った。

### MS2 :様々な非晶質体と市販品の「製剤的安定性」を比較し、各指標との相関を明らかにする

昨年度(1年目)は、様々な処方製剤を加速試験で安定性を評価したところ、PGFEの配合によって固化し、外観の品質低下に繋がったものの、非晶質性には影響を与えないことが示唆された。

そこで本年度(2年目)は、実際に、水溶性に与える影響を解析し、製剤の機能的な観点から、さらに検証を進める。また、研究代表者はこれまでに、PVP以外にも、食品添加物として認可されている高分子ポリマーであるヒドロキシセルロース(HPC)やヒドロキシメチルセルロース(HPMC)で非晶質化できることや、PGFE以外にも、水溶性を高める分散剤として、ショ糖脂肪酸エステルを同定している。そこで、分散剤や高分子ポリマーの違いによって、安定性に与える影響を比較解析し、高品質な非晶質製剤を開発する際に、安定性の観点から、考慮すべき点の抽出を図った。

昨年度、様々な配合比の非晶質製剤を40℃、75%RHで虐待し、1週間経時的に観察したところ、PGFEの配合量の多い製剤(CUR:PVP:PGFE=16:49:35)を1週間虐待した群において、ケーキングし、外観上の品質低下が認

められた。そこで、これら製剤の水溶性を実際に評価すべく、溶出試験を行った。その結果、未虐待と比較して、3日間の虐待群に加え、ケーキングした7日間の虐待群でも水溶性に変化は認められず、XRD分析による非晶質性には影響を与えないという知見と同様であった。

上述のように、機能性に影響は少なくとも、ケーキングや固化は、食品としての品質を低下させるため、次に、PVP以外高分子ポリマー(HPCとHPMC)で非晶質化させた製剤の安定性を評価した。その結果、4ヶ月の虐待において、PVP配合剤をポリ袋保存した結果、PGFE配合依存的に、明らかに固化した。その一方で、HPMC配合剤とHPC配合剤では、ケーキングや固化は観察されるものの、その程度は、PVP配合剤に比べて、小さいことが示唆された。また、6ヶ月の虐待においても、その傾向は同様であり、利用する高分子ポリマーの違いによって、製剤の安定性が異なることが示された。

さらに、PGFEの配合量依存的に固化が観察されたため、その他の分散剤を配合させて非晶質化させた製剤の安定性評価を試みた。その点、研究代表者はこれまでに、PGFE以外にも、水溶性を高める分散剤として、ショ糖脂肪酸エステルを同定しているため、ショ糖脂肪酸エステルを配合させた非晶質製剤を加速試験した。40℃、75%RHで4ヶ月虐待したところ、使用する高分子ポリマーの種類によって程度に違いが認められるものの、PGFEの配合によってケーキングや固化が観察された。その一方で、ショ糖脂肪酸エステル配合剤では、固化は認められず、製剤的安定性が向上することが示唆された。

そこで、高分子ポリマーや分散剤の違いによって製剤的安定性が異なる要因を探索する一環として、各高分子ポリマーや各分散剤の吸湿性を評価した。40℃、75%RHで1ヶ月虐待した時の重量変化を定量したところ、HPCやHPMCでは、3-4%の増加で

### 別添3

あったのに対し、PVPでは12-13%の増加と、吸湿しやすいことが示された。また、分散剤についても、各種シヨ糖脂肪酸エステルでは、2-5%の増加であったのに対し、PGFEでは14-15%の増加と、吸湿しやすいことが示された。

以上から、各構成素材の吸湿性が、製剤的安定性を低下させる一因であることが示唆された。

上記の成果から、品質を担保したうえで、実用化するためには、アルミ蒸着袋といった吸湿を防止可能な包装を施すことのみならず、非晶質化させるための高分子ポリマーや分散剤の吸湿性を考慮することが対応策になりうることを示された。

2年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**PGFEの配合製剤を虐待することで固化し、外観の品質低下に繋がったものの、非晶質性に加え、水溶性にも影響を与えないことが示唆された。**

**また、高分子ポリマーや分散剤の種類を変えて比較解析したところ、PVPよりはHPCやHPMC、PGFEよりはシヨ糖脂肪酸エステルの方が、吸湿性が低く、固化させにくいことが示唆された。**

**最終的に、品質を担保したうえで、実用化するためには、①アルミ蒸着袋といった吸湿を防止可能な包装を施すことにくわえ、②非晶質化させるための高分子ポリマーや分散剤の吸湿性を考慮することが対応策になりうる。**

### C-3. 動態学的因子の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、本年度は、動態の中でも、「吸収性」の観点から、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標の抽出を図った。

**MS3 :様々な非晶質体と市販品の「動態学的因子」を比較し、品質/毒性との相関を明らかにする**

昨年度(1年目)は、静脈内投与後の血中CUR濃度

のプロファイルから、2コンパートメントモデルにフィッティングできることを明らかとし、吸収過程のみならず、消失過程もより詳細に評価可能となり、様々な処方動態学的因子を比較するための基盤を構築することができた。

上記の成果を踏まえ、本年度(2年目)は、様々な処方の吸収性プロファイルと比較し、品質/毒性に関連するパラメーターの抽出を図った。

まず、CURとPVP、PGFEの「混合比」を変えた非晶質製剤を経口投与したところ、血中への移行量(Area Under Curve : AUC)は異なるものの、 $t_{max}$ などの吸収プロファイルには変化を与えなかった。そこで次に、高分子ポリマーの種類を変えて検証したところ、HPC配合剤では、 $t_{max} \cdot C_{max} \cdot AUC$ ともに低く、吸収性が低下することが示された。また、興味深いことに、HPMC配合剤では、PVP配合剤に比較して、 $C_{max}$ は低下するものの、経口投与後8時間での血中濃度は上回っており、最終的なAUCは大きく変化しないことが示された。これらの結果は、代謝・排泄・蓄積性との兼ね合いになるものの、高分子ポリマーの使い分けによって、 $C_{max}$ を抑制しつつも、徐放させ、血中濃度変化を少なくするという制御も可能であることを示している。

2年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**経口投与後の吸収過程と消失過程を評価できる系を構築した。**

**高分子ポリマーを使い分けることによって、吸収プロファイル(速効型・徐放型)を変化させることができ、代謝/排泄/蓄積性も考慮することで、製剤設計を最適化できる可能性を有す。**

上記の成果を踏まえ、今後は、分散剤の違いによって、吸収性プロファイルに与える影響を精査し、品質/毒性に関連するパラメーターの抽出を目指す。



#### C-4. 蓄積性の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、本年度は、動態の中でも、「蓄積性」の観点から、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標の抽出を図った。

**MS4 :様々な非晶質体と市販品の「組織分布/蓄積」を比較し、品質/毒性との相関を明らかにする**

昨年度（1年目）は、水溶性の低い市販製剤と水溶性の高い独自処方を活用することで、吸収性に依存した組織分布を収集でき、適切に評価できていることが示唆されたため、様々な処方の組織分布プロファイルと比較するための基盤を構築することができた。その一方で、MS4を達成するためには、「組織分布」のみならず、毒性に大きく影響を与える「蓄積性」の観点から比較解析する必要がある。

そこで、今年度（2年目）は、一定期間、水を飲水させた後のCURの組織分布量を比較することで、蓄積性を評価可能な系を構築のうえ、MS2・MS6との相関を図る。

昨年度は、独自の非晶質CUR溶液を3ヶ月間自由飲水させた後、各臓器中CUR量をLC-MS/MSで定量比較したところ、各種臓器でCURが検出され、その量は、市販品のCUR溶液を自由飲水させた群に比較して多いことが示されている。そこで、同様のプロトコルで、3ヶ月間自由飲水させた後、CUR溶液の摂取を24時間中断させた後に、各臓器中CUR量を解析した。その結果、3ヶ月の自由飲水直後に解剖した群では、各種臓器で分布が確認された一方で、CURの飲水を24時間中断させてから解剖した群では、組織分布は観察されなくなった。

以上から、高水溶性非晶質CUR製剤は、吸収性が高く、組織分布量も多いながら、代謝・排泄などが要因となって、蓄積性が低いことが示され、安全性が高いことが示された。

2年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**様々な CUR 製剤の組織分布量を解析するための系を構築でき、既存製剤に比較して多くの CUR が組織分布することを示した。**

**また、組織分布した CUR は、24 時間以内に代謝/排泄され、蓄積性が少なく、安全性が高いことが示された。**

今後、動態を考慮し、蓄積性が低いことが安全性担保に重要である汎用性を他の素材で検証する。

#### C-5. 代謝の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、本年度は、動態の中でも、「代謝」の観点から、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標の抽出を図った。

**MS5 :様々な非晶質体と市販品の「代謝/排泄量」を比較し、品質/毒性との相関を明らかにする**

本マイルストーンでは、上記の蓄積性に関連し、安全性に重要な代謝や排泄に着目する。今年度（2年目）は、CURの代謝物プロファイルを解析し、それらを定量することで、MS2・MS6と相関を図った。

まず、CURの代謝物プロファイルを明らかにするため、非晶質CURを投与したラットから採血し、血中に含まれるCUR由来代謝産物をLC-MSにより網羅的に解析した。その結果、CUR投与後血漿では、コントロール血漿のクロマトグラムには検出されていないピークがいくつか検出された。そこで、詳細にMS分析したところ、543.5, 447.5, 623.4のプロダクトイオンであって、分子量から代謝物を推定すると、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合/硫酸抱合体であることが示唆された。特に、ピークの大きさからグルクロン酸抱合体が多く存在する可能性が見出された。

グルクロン酸抱合体が主要な代謝物と推定できたため、次に、末梢血中のCUR未変化体とグルクロン

### 別添 3

酸抱合体量を定量した。その結果、未変化体・グルクロン酸抱合体ともに、検出されたものの、その殆どは、グルクロン酸抱合体であり、速やかに代謝されていることが示唆された。

以上の成果から、本年度、以下の知見を見出した。

**CUR の代謝物としては、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合/硫酸抱合体が見出され、特に、グルクロン酸抱合体がその多くを占めている可能性を見出した。**

**吸収された後、CUR は末梢血中において、その殆どはグルクロン酸抱合体として存在していたため、速やかに代謝されており、安全性が高いことが示唆された。**

上記の成果を踏まえ、今後は、CUR未変化体とグルクロン酸抱合体の排泄を評価する。特に、CURは胆汁酸排泄されることが一般に知られているが、高吸収の場合にも尿排泄が起きないのか検証する予定である。

#### C-6. 一般毒性の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、本年度は、毒性の中でも、「一般毒性」の観点から、評価系の構築と、高吸収化体開発における安全性を担保するための指標の抽出を図った。

**MS6 :様々な非晶質体と市販品の一般毒性を比較し各指標との相関を明らかにする**

昨年度（1年目）は、最も水溶性が高い非晶質クルクミン製剤を 28 日間摂取させることで、肺重量の増加と肝臓障害が、様々な処方の毒性を比較するうえで、発現しやすい項目であることが示唆された。しかしながら、本検討のみでは、様々な処方の毒性を比較するための指標には精度の観点などからなりえていなかった。

そこで、本年度（2年目）は、90日間の反復投与に

よって、肺重量の増加と肝臓障害への影響を中心に、一般毒性を詳細に解析した。

マウスに水、Control 溶液（非晶質 CUR 製剤の含有成分である PVP と PGFE）、非晶質 CUR 製剤を毎日 50 mg/kg <60 kgの成人が市販の CUR 製品[50 mg CUR ほど]を毎日摂取した場合の 60 倍多い量を曝露 > だけ、90 日間強制経口投与し、一般毒性を評価した。

まず、①肺重量を始め、臓器重量に着目して解析した。体重・脳重量・肺重量・肝重量・腎重量・脾重量を測定した結果、non-treat 群、Control 群と比較して、非晶質クルクミン製剤投与群の体重・いずれの臓器においても、重量変化は認められなかった。

昨年度の 28 日間連続投与試験において、肺重量の増加傾向が認められた要因としては、各マウスから単離した肺の脱血の状態や、乾燥状態が影響した可能性が考えられた。

次に、②肝臓障害を始め、各種臓器障害に着目して解析すべく、生化学試験を試みた。肝臓障害マーカー ALT (Alanine transaminase)、腎臓障害マーカー BUN (Blood urea nitrogen)、胆道閉塞マーカー LAP (Leucine aminopeptidase) を測定した結果、non-treat 群、Control 群に比較して非晶質 CUR 製剤投与による生化学マーカーの有意な変動は認められなかった。

さらに、非晶質 CUR 製剤投与による組織障害を詳細に検討するため、病理像を解析し、各組織における所見を定量評価した。その結果、大脳・小脳・肺・腎臓・脾臓・胃・腸・子宮・卵巣いずれの臓器においても、非晶質クルクミン製剤投与による有意な組織障害は認められなかった。その一方で、非晶質 CUR 製剤の分布量が最も多い肝臓では、大きな毒性ではないものの、軽度の組織障害が認められた。

最後に、③血球成分数も評価したところ、赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値・白血球

### 別添 3

数に関して、Control 群に比較して有意な変動は認められなかった。また、白血球を分画し、リンパ球・単球・好中球・好酸球・好塩基球の割合を解析しても、正常範囲を超える有意な変動は認められなかった。

2年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**最も水溶性が高い非晶質クルクミン製剤を 28 日間/90 日間摂取させることで、肝臓に着目した解析系が、様々な処方毒性を比較するうえで、適していることが示唆された。**

上記の成果を収集したものの、蓄積性・代謝の解析から、CURの毒性発現は見にくいのが現状である。そこで、今後は、より高感度に毒性を評価するため、健常なマウスに加え、老化マウスにおいても解析を進めるとともに、他の非晶質製剤でも検証する予定である。

**D. 考察** C. 研究結果の欄に記載。

### E. 結論

当該研究では、吸収性や消失速度などの特性が異なる様々な非晶質製剤について、①物性(分子間相互作用/安定性)と②動態(吸収/分布/代謝/排泄)、③毒性(一般/特殊毒性)の観点から比較しつつ、各項目を紐づけて解析することで、高吸収化機能性食品を開発する際の安全性評価指標を抽出することを目的として、本年度は以下の知見を得た。

- ① 「CUR 同士の相関ピークの消失」を指標に、非晶質性の質を担保しうることが提示した。
- ② PGFEの配合によって固化しやすくなるものの、水溶性には影響しないことを提示するとともに、高分子ポリマーや分散剤自体の吸湿性に違いがあり、固化の要因になりうることを示した。

- ③ 高分子ポリマーの使い分けで、吸収プロファイル(速効型/徐放型)を制御しうることが提示した。
- ④ 組織分布した CUR は、24 時間以内に代謝/排泄され、蓄積性が少なく、CUR は高吸収化製剤としても安全性が高いことを提示した。
- ⑤ CUR の代謝物として、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合/硫酸抱合体が見出され、特に、グルクロン酸抱合体が多くを占めていることを見出した。
- ⑥ CUR の毒性評価としては、肝臓に着目した系が適しうることが示唆された。

さらに、これらの成果をまとめて考えることで、安全な高吸収化機能性食品の開発のためには、以下の対応策を講じることが重要な可能性を提示した。

1. [水溶性]と[安定性]の解析から、高水溶性非晶質製剤の品質を担保するためには、①アルミ蒸着袋のように、「包装」を考慮するか、②水溶性と製剤的安定性のバランスで「分散剤 PGFE の配合量」を調整するか、③非晶質化させるための「高分子ポリマーや分散剤の吸湿性」を考慮することが、高吸収化非晶質製剤の品質担保に対する対応策になりうる。
2. [吸収]の解析から、高分子ポリマーを使い分けることによって、吸収プロファイル(速効型・徐放型)を変化させることができ、安全で有用な製剤設計を最適化することが可能である。
3. [蓄積性]と[代謝]、[毒性]の解析から、安全性評価では、単に、機能性食品を投与して、毒性を観察するのではなく、食品成分の蓄積性や代謝といった動的要素をセットで考慮することにより、高確度で理論的な毒性発現予測につながりうることを提示した。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### ① 論文発表

#### 原著論文

該当なし。

#### 総説・その他

該当なし。

### ② 学会発表

#### 国内学会発表

1. **長野一也**, 武田真梨子, 吉田卓也, 今川直樹, 前北 光, 木下圭剛, 中尾友洋, 坂田 慎, 西野雅之, 原田和生, 平田收正, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 独自の非晶質処方による高水溶性クルクミン製剤の開発と有用性評価., 日本薬剤学会第 34 年会., 富山 (富山), 2019 年 5 月.
2. **長野一也**, 平井はるな, 前北 光, 今川直樹, 木下圭剛, 中尾友洋, 坂田 慎, 西野雅之, 原田和生, 平田收正, 橘 敬祐, 土井健史, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: FDS を活用した高品質な機能性食品の開発～新規非晶質クルクミンのトリグリセリド低下作用・機序の解析～., 第 25 回日本食品化学学会., 松本 (長野), 2019 年 6 月.
3. **長野一也**, 前北 光, 木下圭剛, 中尾友洋, 坂田 慎, 西野雅之, 平田收正, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 高品質な機能性食品開発における Food Delivery System の確立を目指した、非晶質クルクミンの吸収性・効能・安全性の多角的な連関解析., 第 35 回日本 DDS 学会., 横浜 (神奈川), 2019 年 7 月.

4. **長野一也**, 平井はるな, 前北 光, 今川直樹, 木下圭剛, 中尾友洋, 坂田 慎, 西野雅之, 原田和生, 平田收正, 橘 敬祐, 土井健史, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 高品質な機能性食品開発のための FDS の最適化を目指した、新規非晶質クルクミンの中性脂肪低下作用の解析., 第 66 回日本食品科学工学会., 札幌 (北海道), 2019 年 8 月.
5. **長野一也**, 前北 光, 平井はるな, 今川直樹, 木下圭剛, 中尾友洋, 坂田 慎, 西野雅之, 原田和生, 平田收正, 橘 敬祐, 土井健史, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: Food Delivery System を基盤とした新規非晶質クルクミンの脂質代謝改善作用の解析., 日本薬学会第 140 年会., 京都 (京都), 2020 年 3 月.

#### 国際学会発表

1. Nakao T., **Nagano K.**, Kinoshita K., Sakata M., Nishino M., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Anti-dyslipidea effect and its mechanism of amorphous curcumin., International Congress on Food Factors (ICoFF) 2019, Kobe (Japan), 28 November-5 December, 2019.

シンポジウム: "The effects of highly bioavailable quercetin glycoside and curcumin"での発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### ① 特許取得

1. **長野一也**, 堤 康央, 東阪和馬, 木下圭剛: クルクミン含有製剤、並びにその吸収性又は溶出性の評価方法., WO/2018/159853 (PCT/JP2018/008187 (基礎特許: 特願 2017-041174))  
現在、日本/米国/欧州/中国/韓国に国内移行

### 別添 3

米国：審査中、日本/欧州/中国/韓国：審査請求待ち

2. **長野一也**、堤 康央、東阪和馬、中尾友洋：  
クルクミン含有製剤., WO/2018/159852  
(PCT/JP2018/008186 (基礎特許：特願  
2017-041173)) .

現在、日本/米国に国内移行

米国：審査中、日本：審査請求待ち

### ② 実用新案登録

該当なし。

### ③ その他

1. 化学工業日報（2019年10月30日（水）1面のトップ記事）に、高品質な機能性食品の開発研究の成果が掲載された。

尚、下記に本研究の協力研究者を列挙する。

鍋師裕美	国立医薬品食品衛生研究所
吉田卓也	大阪大学大学院薬学研究科
堤 康央	大阪大学大学院薬学研究科
辻野博文	大阪大学大学院薬学研究科
東阪和馬	大阪大学大学院薬学研究科
平田收正	大阪大学大学院薬学研究科
原田和生	大阪大学大学院薬学研究科
前北 光	大阪大学大学院薬学研究科
今川直樹	大阪大学大学院薬学研究科
粟飯原未貴	大阪大学大学院薬学研究科
原田実季	大阪大学大学院薬学研究科
吉本梨紗	大阪大学大学院薬学研究科