

**厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業**

**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**

**2018-2020 年度 総合研究報告書**

**研究代表者 長野一也**

**令和 3 年（2021 年）4 月 26 日**

## 目次

<b>I. 総合研究報告</b>	<b>1</b>
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 長野一也	1
<b>II. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	<b>20</b>

**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、以下のマイルストーンを設定し、3年間研究を進めてきた。

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

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

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

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

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

MS6 :様々な非晶質体と市販品の「一般毒性/特殊毒性」を比較し、各指標との相関を明らかにする

MS7 :物性や動態解析によって収集された知見は、品質や毒性情報と紐付けすることで、

安全な高吸収製剤を開発するための指標を抽出する

その結果、以下の知見や指標を収集した。

**【 MS1 : 分子間相互作用 】**

- ✓ <sup>1</sup>H-NMRで「半値幅」を指標に、非晶質性の質（製剤の均一性）を評価可能なことが提示
- ✓ IRで「CURピークのシフトの程度」を指標に、非晶質性の質（製剤の均一性）を評価可能なことが提示
- ✓ NOESYで「CUR同士の相関ピークの消失」を指標に、非晶質性の質（製剤の水溶性）を評価可能なことが提示
- ✓ Taylor分散分析で「CURの拡散速度」を指標に、非晶質性の質（水溶性の維持）を評価可能なことが提示

**【 MS2 : 安定性 】**

- ✓ 外観のみならず、X線回折で「ハローピーク」を指標に、非晶質の安定性を評価可能なことが提示

【 MS3 : 動態学的因子 】

- ✓ 吸収プロファイルや、吸収後のコンパートメントモデルをフィッティングし、「Cmax, Tmax, AUC、 $\alpha$ 相/ $\beta$ 相の速度といった動態学的因子」を指標にすることで、効能の発現予測/安全性を推定可能なことが提示

【 MS4 : 組織分布/蓄積 】

- ✓ 各組織での分布量（経時的な解析により蓄積量）を評価できる分析系を構築することで、「分布量や蓄積量」を指標に、安全性を推定可能なことが提示

【 MS5 : 代謝/排泄 】

- ✓ 代謝物を特定し、その定量系を構築することで、「代謝物量や排泄量」を指標に、安全性を推定可能なことが提示
- ✓ 「代謝物」を1つの指標にすることで、経口曝露後に吸収されずに糞便排泄されているのか、体内に吸収されたうえで、胆汁酸排泄されているのかを推定可能なことが提示

【 MS6 : 毒性 】

- ✓ 「分布量の多い組織」を指標にすることで、毒性発現を観察しやすくなることが推定された。ただし、食経験があって、安全性の高い成分の評価にあたっては、*in vitro*試験の結果や動態（ADME）の結果と組み合わせることも求められる

上記をもとに、以下の安全な高吸収化機能性食品を開発支援するための対応策が考えられた。

1. [水溶性]と[安定性]の解析から、PGFEのような分散剤を追加配合した高水溶性非晶質製剤は、非晶質性に影響を与えないものの、外観として、固化しやすくなるため、そ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」を考慮し、「適切な分散剤の選択」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. [動態]と[水溶性・吸収性]の解析から、単に、水溶性を高めて、吸収性を亢進（AUCが大きい）させるだけではなく、その質（最高血中濃度や徐放性）を考慮し、高分子ポリマーや分散剤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るため、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、安全性評価においては、労力のかかる垂急性毒性試験（90日間の反復連日投与試験）や慢性毒性試験（12ヶ月間の反復連日投与試験）だけに頼るのではなく、MS4の蓄積性や、代謝や排泄の程度や速度を評価項目として理解することが、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。

- ※ 当該研究では、CURの高水溶性・高吸収性非晶質製剤をモデルに、安全性評価指標の抽出を図り、上述の知見が収集されているものの、同様の非晶質処方により、レスベラトロールやシリマリリンも水溶性が向上することから、さらなる検証・確認は必要なものの、本事業で収集された成果は、他の成分に対しても適用できる可能性があることを申し添える。

## 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、CUR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、そのまま当て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CUR【特願2015-201582】をモデルに、市販されている高吸収性CUR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CUR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****試薬**

非晶質 CUR は、CUR 標品 >98% (長良サイエンス株式会社、Gifu、Japan) とポリビニルピロリドン K30(PVP) (BASF ジャパン株式会社、Tokyo、Japan)、ポリグリセリン脂肪酸エステル (PGFE) (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社、Osaka、Japan より提供) を CUR: PVP : PGFE = 16 : 49 : 35 の割合で加熱混練することで作製した。

その他に利用した試薬は以下から購入した。β-グルクロニダーゼ溶液 ヘリックスポマチア由来 : 10 万 U/mL (和光純薬工業株式会社、Osaka、Japan) ・ イソフルラン生化学用 (和光純薬工業株式会社) ・ アセトニトリル / LC-MS グレード (和光純薬工業株式会社) ・ メタノール / LC-MS グレード (和光純薬工業株式会社) ・ 酢酸エチル / LC-MS グレード (和光純薬工業株式会社)、・ 超純水 / LC-MS グレード (和光純薬工業株式会社)、ギ酸 / LC-MS グレード (和光純薬工業株式会社) ・ Curcumin β-D-Glucuronide Sodium Salt 1mg (Toronto Research)

**<sup>1</sup>H-NMR による分子間相互作用解析**

1 mg CUR/mL 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)
温度	: 37°C
NOESY mixing time	: 100 ms
観測幅	: 8000 Hz (13.3 ppm)
観測中心周波数	: 599 MHz (4.67 ppm)
測定ポイント数	: 512* x 128*
積算	: 32 回
繰り返し時間	: 3 秒

**IRによる分子間相互作用解析**

下記の条件で各非晶質製剤をIR解析に供した。

使用機器 : Frontier (PerkinElmer)

解析方法 : KBr 錠剤法

適合方法 : Voigt 関数によるカーブフィッティング

**Taylor 分散分析による拡散係数の解析**

各 CUR 製剤の拡散係数 (水中 100 μg CUR/mL) は、Viscosizer-TD (Malvern Instruments、Worcestershire、UK) を使用した Taylor 分散分析によって計算した。サンプル溶液をキャピラリーに注入し、UV 吸光度 (λ = 280 nm) でモニターした。サンプルがキャピラリー内を流れている間、t1 と t2 (t2 > t1) に 2 つのピークが検出され、拡散係数 (D) は次式で算出した。

$$D = r^2 (t_2 - t_1) / 24 (\tau_{22} - \tau_{12})$$

(r : 毛細管半径、t : 温度、τ : ピーク幅)

**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

**実験動物**

Sprague-Dawley rat (雄性) とBALB/cマウス (雄性) は、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka、Japan) より購入し、7週齢で実験を開始した。実験の前日には絶食させ、温度23°C、湿度55%、12時間ごとに明暗を繰り返した。本研究における動物実験の飼育/実験は大阪大学動物実験規定に準じた。

**コンパートメントモデル解析**

ラットに試料 (CURとして10 mg/kg) を頸静脈投与した。1、3、5、7、10、20、30、40、50、60、90、120、180、240、480分後に採血し、血漿中CUR濃度を求めた。さらに2-コンパートメントモデルに基づいて、下記式より $\alpha$ 相、 $\beta$ 相の半減期を求めた。

**吸収性評価**

Sprague-Dawley rat (雌性) 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  $\mu$ L) に 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L、除蛋白のため、250  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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, 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。

**LC-MS/MS 測定条件**

項目	設定値
LC	
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

**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	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

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%)

**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ヵ月摂取させた。3ヵ月自由飲水後、脱血/解剖し、心臓、肺、脾臓、生殖器、脳、腎臓、肝臓を回収し、-80°Cで保存した。

**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
LC	
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

MS 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

### 非晶質 CUR の排泄の評価

非晶質 CUR、市販品をそれぞれ 100 mg CUR/kg で SD ラットに経口投与し、経時的に（尿：0, 1, 2, 4, 9, 12, 24, 36, 48 時間、糞：12, 24, 36, 48 時間）尿と糞を採取した。

尿と糞中の CUR 量を解析するため、尿試料と、糞重量の 2 倍量の水でホモジネートした試料それぞれに 10  $\mu$ L 酢酸緩衝液 (pH 4)、 $\beta$ -グルクロニダーゼを 25  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、内部標準として 200 ng/mL curcumin- $d_6$  溶液を 50  $\mu$ L を添加した。液液抽出のため、250  $\mu$ L 酢酸エチル/メタノール = 95/5 を加え、ボルテックス後、10,000 x g, 5 分, 4°C で遠心し、酢酸エチル層を回収する作業を 3 回行った。回収した上清を窒素乾固させた。乾固したサンプルは、80%メタノール 200  $\mu$ L で再溶解し、10,000 x g, 5 分, 22°C で遠心した後、上清を 0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターにてろ過し、LC-MS/MS の測定に用いた。

CUR の未変化体量は、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理しないことで算出し、グルクロン酸抱合体量は、その差分から算出した。

### 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。

【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  $\mu$ 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。

### 老化マウスを用いた解析

老化マウスとしては、Senescence Accelerated Mouse (SAM) を利用した。SAM は、京都大学結核胸部疾患研究所病理学部門 (現・再生医化学研究所再生誘導研究分野) において、AKR/J 系マウスと未知の系統との不測の交雑が生じたマウスコロニーから、老化度評点の加齢依存的な急速な増加を指標として確立されたマウス系統であり、促進老化・短寿命を示す Senescence-Accelerated Mouse Prone (SAMP) 系統と正常老化を示す Senescence-Accelerated Mouse Resistant (SAMR) 系統の 2 系統がある。SAMP 系統の中でも、老化アミロイドーシスや免疫機能不全、腎萎



### 別添 3

縮などの特徴的形質を示す SAMP1 と SAMR (対照コントロール)を用いた。それぞれに、通常食と CUR 配合食を 4 ヶ月間摂食させた。血球成分数は多項自動血球分析装置 (シスメックス, Kobe, Hyogo) で、生化学マーカーは生化学自動分析装置 (Fuji DRI-CHEM 4000V, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

### 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

---

## 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、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**

まず、核磁気共鳴法 ( $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance法:  $^1\text{H}$ -NMR) を用いて、溶液中における非晶質製剤 [CUR / 高分子ポリマー: ポリビニルピロリドン (PVP) / 新規分散剤: ポリグリセリン脂肪酸エステル] の CUR 状態を分子レベルで評価した。その結果、低極性溶媒の DMSO 中では、CUR のベンゼン環のプロトン領域 (7 ppm 付近) にシャープなピークが観測され、CUR は一分子として溶解していることが示された。その一方で、重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 中では、ブロードなピークとして観測され、見かけの分子量が大きくなっていることが示された。このことから、非晶質製剤の CUR は、水に溶解した際、水溶液中で PVP や PGFE などの構成成分と相互作用している可能性が示された。そこで、製剤の「水溶性」と「分子間相互作用」の関連を検証するため、様々な処方を比較する前に、水溶性の低い従来処方 [CUR/PVP] と、水溶性の高い独自処方 [CUR/PVP/PGFE] をモデルに、各ピークのブロード性を半値幅で評価した。その結果、水溶性の低い従来処方に比較して、水溶性の高い独自処方の方が、半値幅が広く、PGFE が配合された分、分子間相互作用の寄与が大きくなっていることが示唆され、分子間相互作用に着目することで、高い水溶性の機序を明らかにできる可能性が考えられた。

そこで、分子間相互作用の詳細を解析するため、赤外分光法 (Infrared Spectroscopy: IR) により、水溶性の低い従来処方と水溶性の高い独自処方を比較した。その結果、いずれの製剤も、CUR に特徴的

なピーク ( $1510\text{ cm}^{-1}$  付近) と、PVP に特徴的なピーク ( $1463\text{ cm}^{-1}$ 、 $1496\text{ cm}^{-1}$  付近) を併せ持っていたものの、 $1510\text{ cm}^{-1}$  付近のピークプロファイルが異なっていた。そのため、各製剤で観察された波形を分離することで、ピークプロファイルの違いを観察した。その結果、水溶性の低い従来処方では、CUR 原体由来の  $1510\text{ cm}^{-1}$  のピークが残存していることに加え、 $1515\text{ cm}^{-1}$  にシフトしたピークが検出された。その一方で、水溶性の高い独自処方では、CUR 原体由来の  $1510\text{ cm}^{-1}$  ピークは完全に消失し、 $1515\text{ cm}^{-1}$  にシフトしたピークのみが確認された。これらの結果から、従来処方・独自処方ともに、CUR が非晶質化しているものの ( $1515\text{ cm}^{-1}$  にシフトしているものの)、従来処方では、IR で検出可能な程度の結晶性 CUR ( $1510\text{ cm}^{-1}$  のピーク) が残存しているのに対し、独自処方では、IR で検出可能な結晶性 CUR ( $1510\text{ cm}^{-1}$  のピーク) が残存せず、より均質な製剤であることが示唆された。

そこで次に、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  $^1\text{H}$ -NMR: NOESY を活用し、各成分同士の分子間相互作用を詳細に解析することで、吸収性向上の作用機序の解明を図った。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 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

### 別添 3

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 $\pi$ - $\pi$ 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。したがって、これら分子機序によって、本製剤の非晶質性が高まり、水溶性が向上した結果、吸収性が亢進したものと考えられた。その一方で、本製剤の特徴としては、高い水溶性に加え、それが長時間維持される点にあり（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）、その機序解明も安全性評価指標の抽出に繋がることが期待される。

そこで最後に、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した。

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）をキャピラリー泳動し、Taylor分散分析により、各処方におけるCURの拡散係数を算出した。その結果、水溶性の低い既存製剤（CUR/PVP）のCURの拡散係数が $53.3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ であったのに対し、水溶性の高い独自製剤（CUR/PVP/PGFE）のCURの拡散係数は $30.4 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ と、CURの拡散速度が抑制されていることが示された。また、拡散係数と水溶性との相関をより詳細に検証するため、PGFEと同様に、高い水溶性を維持可能なショ糖脂肪酸エステルを配合した処方でも解析したところ、CURの拡散係数は $30.3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ と、水溶性の高い独自製剤（CUR/PVP/PGFE）のCURの拡散係数と同等であり、製剤中でのCURの拡散速度が高水溶性維持に寄与し

ていることが示唆された。以上の成果から、CURは、PGFEが配合されることで、PVP単独より、PVP/PGFE複合体に強く補足され、拡散が抑制されることで、CUR同士の接触機会が減少し、再結晶化しにくい機構が考えられた。したがって、非晶質化による高吸収製剤開発における品質を評価するための指標として、主成分の「拡散係数」が有用であることが提示された。

また、昨年度の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、固化しやすくなることを報告している。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）」を考慮する必要性を提示してきた。本年度の知見も合わせて考えれば、PGFEの配合によって、水溶性の向上のみならず、高い水溶性も維持されることから、高吸収製剤開発にはより重要な因子であることが示され、上記の①と②の対策が必須である。さらに、本年度、新たな分散剤として、ショ糖脂肪酸エステルの存在を示したことから、今後、さらに詳細な解析は必要なものの、③製剤によって「適切な分散剤の選択」も対策として提示できることが示された。

以上、MS1について、3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」や「その維持」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 ( $1510 \text{ cm}^{-1}$ 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、4) Taylor 分散分析による CUR の拡散係数で評価可能なことが示唆された。**

**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、包装を考慮するか、③製剤によって適切な分散剤を選択する必要が提示された。**

## 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、物性の中でも、「製剤的安定性」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。

**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**

まず、調製してから1年以上室温で保存した非晶質製剤について、X線回折によるハローピーク（なだらかなピーク）の程度を解析した。その結果、ハローピークとして観察され、control群と比較して大きな違いは認められず、本条件下では安定性が高いことが示唆された。

そこで、より過酷な条件で安定性に影響を与える因子の探索を試みた。40℃/75% RHによる加速試験により、CURとPVPの配合比を変えた製剤（CUR:PVP=15:85, 25:75, 30:70）や、これにPGFEを25%加えた製剤について、低密度ポリエチレン袋とアルミ蒸着袋（吸湿防止群）で保管し、4ヶ月と6ヶ月経過後の外観をそれぞれ観察した。その結果、4ヶ月経過時において、低密度ポリエチレン袋保管では、PGFEを配合していない従来処方であっても、変色とケーキングが認められた。さらに、PGFEを配合した独自処方では、固化しており、PGFEを配合することで安定性が低下していた。その一方で、アルミ蒸着袋保管では、control群と比較して大きな違いは認められず、吸湿による影響であることが示唆された。また、6ヶ月経過時において、低密度ポリエチレン袋保管での変色とケーキング、固化の具合が進行している以外、群間での傾向は同様であった。そこで、固化が、PGFEの影響であることを精査するため、PGFEの配合量を変化させて、1週間経時的に観察した。その結果、PGFEの配合量

に依存して、固化していたため、PGFEによる寄与が示された。

次に、安定性の低下が、非晶質化に与える影響を解析するため、加速試験された試料をそれぞれX線回折により解析した。その結果、予想（ハローピークは消失し、CURのシャープなピークが検出）に反して、変色やケーキング、固化していても、ハローピークとして観察され、非晶質性に影響を与えていない可能性が考えられた。

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、未虐待に比較して、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。

上記の成果から、非晶質性に影響していないことが想定されたものの、変色やケーキング、固化は、機能性食品の開発にあたっては、大きな課題にもなるため、実用化に向けては、アルミ蒸着袋での保管では固化が進まなかったことから、吸湿を防止可能な包装を施すことが1つの対応策であることが示唆された。

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以外の高分子ポリマー（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

### 別添 3

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、シヨ糖脂肪酸エステルを同定しているため、シヨ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、シヨ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ということが示された。

2 年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**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、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**

我々はこれまで、CURとPVP、PGFEの混合比を変えて、様々な非晶質製剤を作製し、経口投与したところ、血中への移行量 (Area Under Curve : AUC) の異なる製剤を開発してきた。そこで、様々な製剤の動態学的因子を比較するため、最も水溶性の高い製剤をモデルに静脈内投与し、各種コンパートメントモデルに当てはめ、吸収率などの算出を図った。その結果、静脈内投与20分以内に血中CUR濃度が大きく減少し、その後、緩やかに減少する2相性のプロファイルが観察された。そのため、2コンパートメントモデルに当てはめたところ、適切にフィッティングされた ( $\alpha$ 相の半減期 : 0.08 hr、 $\beta$ 相の半減期 : 1.25 hr) 。したがって、吸収過程のみならず、消失過程も評価可能となり、様々な処方 of 動態学的因子を比較するための基盤が構築された。

また、上記の成果を踏まえ、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 (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。

### 別添3

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。

そこで次に、上記の成果を踏まえ、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試みた。PGFEと同様に、既存の非晶質処方比べて、高い水溶性を実現する分散剤：シヨ糖脂肪酸エステルを配合した処方非晶質製剤を調製し、ラットに経口投与して、その吸収性をLC-MS/MSで定量した。その結果、PGFEを分散剤として配合した非晶質製剤に比較して、シヨ糖脂肪酸エステルを分散剤として配合した非晶質製剤では、 $C_{max}$ は低いものの、徐放性が高く、24時間までのAUCはほぼ同程度であることが示された。

これらの成果から、非晶質製剤を構成する高分子ポリマーや分散剤を変化させることで、吸収プロファイル（速効型・徐放型）を制御できることが示され、効能と安全性の観点から、製剤をデザインすることができることが提示された。

以上、MS3について、3年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**高吸収性の CUR 製剤を活用することで、CUR は吸収過程において、2 コンパートメントモデルにフィッティングされ、その吸収プロファイルに、製剤を構成する高分子ポリマーや分散剤の違いによって、その吸収プロファイルを速効型や徐放型に**

**変化させることが可能であることが示された。**

**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、AUC の大きさのみならず、その質（最高血中濃度や徐放性）を理解したうえで、制御することが重要であることを提示した。**

#### C-4. 組織分布/蓄積の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、動態の中でも、「組織分布/蓄積」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。

**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**

独自処方による非晶質製剤を開発したことにより、CURの水溶性が高くなったため、自由飲水による簡便かつ長期的な投与が可能となった。そこで、まずは、最も水溶性の高い製剤と、その対照として市販製剤を3ヶ月間自由飲水させ、脱血後に、各種臓器（心臓・肺・脾臓・脳・精巣・腎臓・肝臓）を回収・メタノールで抽出し、各臓器に含まれるCURをLC-MS/MSにて定量した。その結果、水溶性・吸収性の改善を謳った市販製剤であっても、我々が開発した製剤に比較すると、水溶性・吸収性ともに低かったことを反映し、いずれの臓器においても、検出されたCURは低値であった。その一方で、独自処方による非晶質製剤投与群では、肺や脾臓、肝臓など、主要な臓器で分布が観察された。したがって、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を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。

### 別添3

そこで、次に、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との相関を図った。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。**

#### C-5. 代謝/排泄の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、動態の中でも、「代謝/排泄」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**

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。MS4（肝臓での蓄積性の評価）においても、3ヶ月CURを摂取させた後、24時間摂取を中止しただけで、肝臓でCURは検出されなくなり、蓄積性も低いことを考えると、安全性が高いことが示唆された。

そこで次に、CUR未変化体とグルクロン酸抱合体の排泄を評価した。特に、CURは胆汁酸排泄されることが一般に知られているものの、高吸収の場合には尿排泄も起きていることも考えられるため、糞中と尿中の双方を解析した。市販されているCUR製剤と我々が開発した高水溶性・高吸収性非晶質CURをそれぞれ、ラットに単回強制経口投与し、経時的に、糞便と尿を採取した。本試験では、グルクロニダーゼで処置（グルクロン酸抱合体は、CURとグルクロン酸に分離）した試料と未処置の試料を調製し、それぞれのCUR量を定量した。これにより、グルクロニダーゼ処置試料中CURは、CUR未変化とグルクロン酸抱合体の合計量となり、グルクロニダーゼ未処置試料（CUR未変化体）を差し引くことで、代謝物量を推定した。その結果、市販品投与群では、既存の報告[CURは、胆汁排泄され、尿排泄は認められない]と同様に、尿中排泄はほとんど認められず、その多くは糞中から検出された。その一方で、グルクロニダーゼ処置試料と未処置試料で検出された

### 別添3

CUR を定量すると、どちらも同等であり、糞中に排泄された CUR の殆どは、グルクロン酸抱合体ではなく、CUR 未変化体と考えられた。市販品の吸収性が低いことを考えると、市販品の多くは、胆汁排泄されたのではなく、吸収されずに、そのまま排泄された可能性が考えられた。その一方で、非晶質 CUR では、グルクロニダーゼ処置試料より、未処置試料で検出された CUR 量は少ない傾向が観察され、今後、個体数を増やすなど、より詳細な検討が必要なものの、糞中には CUR 未変化体のみならず、グルクロン酸抱合体も存在している可能性が見出された。したがって、非晶質 CUR 投与群では、吸収後にグルクロン酸抱合体となり、それらが胆汁排泄されていることが示唆された。また、興味深いことに、糞中と比較すると少ないものの、尿中においても、CUR 未変化体とグルクロン酸抱合体が検出され、CUR は、尿中からも排泄されることが明らかとなった。

CUR の体内動態についてはこれまで、経口曝露された CUR が、1)様々な組織に分布すること、2)主にグルクロン酸抱合体に代謝されること、3)殆どが糞中に排泄せることが、部分的に報告されているものの、経口曝露から吸収-分布-代謝-排泄 (ADME) を一連に評価されておらず、本解析結果から、市販の CUR は、吸収されずに、単にそのまま糞に排泄された可能性も推察された。その一方で、非晶質 CUR のように、吸収する CUR を活用することで、ADME を一連に評価でき、吸収-分布-蓄積-代謝-排泄の各項目を連結して考えることで、経口曝露された CUR の運命について、その実態の一端を明らかにすることができた。

これらの成果と MS6 の毒性評価と組み合わせて考えると、非晶質 CUR を反復投与しても、血球成分の変動や生化学マーカーに影響を与えるような組織障害が認められないのは、蓄積性が低く、速やかに代謝/排泄されていることが関わっていることも考

えられる。したがって、食品科学研究における注目度は低いものの、代謝・蓄積・排泄の程度や速度を評価することが、高吸収化体の安全性を担保するためには重要であることが示唆された。

以上、MS5 について、2 年間の研究成果から、以下の知見を見出した。

**高吸収性の CUR 製剤を活用することで、CUR の代謝物として、既に報告のあるグルクロン酸抱合体のみならず、硫酸抱合体とグルクロン酸抱合/硫酸抱合体を見出し、小腸での吸収過程から速やかに代謝されていることを見出した。また、それら未変化体と代謝物は、既に報告のある胆汁排泄のみならず、尿中からも排泄されていることが示された。**

**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、製剤の安全性について、時間と労力のかかる亜急性毒性試験 (90 日間の反復連日投与試験) や慢性毒性試験 (12 ヶ月間の反復連日投与試験) だけに頼るのではなく、MS4 の蓄積性や、代謝や排泄の程度や速度を評価項目として理解することが重要であることを提示した。**

### C-6. 毒性の解析と指標の抽出

下記のMSにおいて、毒性の中でも、「一般毒性」の観点から、より高感度に評価するための系の構築と、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**

様々な処方的一般毒性を効率よく比較するため、まずは、非晶質CUR製剤を反復的に曝露させることで、発現しやすい毒性を探索した。始めに、28日間自由飲水させた後、死亡の有無や血球数の変動、生化学的因子(ALT・AST・BUNなど)の変動、臓器重量などを評価した。その結果、非晶質CUR製剤の摂



### 別添 3

取による死亡例はなく、赤血球、白血球、リンパ球などの血球成分において、正常範囲をこえる有意な変動は認められなかった。また、脳・肺・肝臓・腎臓・脾臓の重量を評価したところ、脳・肝臓・腎臓・脾臓ではcontrol群と比較して変化は認められなかったものの、肺では軽微な重量増加が示された。さらに、生化学マーカーの変動を解析した結果、腎障害マーカー：BUN、胆道閉塞マーカー：LAPはいずれもcontrol群と比較して有意な差は認められなかった。また、肝障害マーカー：ALTは、軽微な上昇が示されたものの、正常範囲をこえる有意な変動ではなかった。

そこで、その詳細を解析するため、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 CUR 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。肝障害マーカーALT (Alanine transaminase)、腎障害マーカー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 CUR 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。以上、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、最後に、より高感度に毒性を評価するため、老化マウスにおいて解析を試みた。老化マウスとしては、Senescence-Accelerated Mouse (SAM) を利用した。SAM は、京都大学結核胸部疾患研究所病理学部門（現・再生医化学研究所再生誘導研究分野）において、AKR/J 系マウスと未知の系統との不測の交雑が生じたマウスコロニーから、老化度評点の加齢依存的な急速な増加を指標として確立されたマウス系統であり、促進老化・短寿命を示す Senescence-Accelerated Mouse Prone (SAMP) 系統と正常老化を示す Senescence-Accelerated Mouse Resistant (SAMR) 系統の 2 系統がある。SAMP 系統の中でも、老化アミロイドーシスや免疫機能不全、腎萎縮などの特徴的形質を示す SAMP1 と SAMR (対照コントロール) にそれぞれ、通常食と

### 別添3

CUR 配合食を4ヶ月間摂食させ、肝臓障害などに与える影響を評価した。まず、血中成分を解析したところ、SAMR マウスに比較して、SAMP1 マウスにおいて、赤血球数や白血球数、リンパ球数が減少し、老化が進んでいることが観察された。本条件下で、昨年度のCURの90日間連日経口投与試験において、軽度な障害が観察された肝臓の生化学マーカー：ALTを解析したところ、障害は観察されなかった。したがって、老化によって、より高感度に非晶質CURの毒性を観察できると仮説して検証したものの、本実験系では、安全性の高感度な評価指標を見出すことはできなかった。

以上、MS4・MS5の蓄積・代謝・排泄の結果と組み合わせて考えると、以下の成果を収集した。

**非晶質CURの毒性は、全身の中では、肝臓が観察されやすい組織ではあるものの、蓄積性が低く、速やかに代謝/排泄されていることもあって、個体の表現型としての毒性を観察することは容易ではないことが示唆された。したがって、食経験があって、安全性の高い食品成分の安全性を評価するにあたっては、各種*in vivo*毒性試験によって安全と判定するとともに、その裏付けとして、各種*in vitro*試験の結果や動態(ADME)の結果と組み合わせて理解することが現実的であることが提示された。**

#### C-7. CUR以外に対する汎用性評価

これまでの研究で収集された成果の汎用性評価を見据え、CUR以外の食品成分への適用を試みた。CURと同様に、優れた効能が報告されているポリフェノールながら、難水溶性のために、その活性を十分発揮できていないレスベラトロール(RES)とシリマリン(SIL)に対し、高分子ポリマー：PVPのみを配合した既存非晶質処方と、分散剤：PGFEを追加配合した新規非晶質処方を調製し、水溶性を比較した。

溶出試験により、経時的な溶解性をHPLCにて評価したところ、RES・SILとともに、PGFEを追加配合することで、水溶性が亢進することが明らかとなった。そのため、さらなる検証・確認は必要なものの、本事業で収集された成果は、他の成分に対しても適用できる可能性が提示された。

**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 水溶性の観点で相互作用に着目し、Taylor分散分析の結果、「各製剤中のCURの拡散速度」を指標に、非晶質性の質(高水溶性の維持)を担保しうることを提示。
- ② 吸収性の観点において、構築したアッセイ系で、様々な製剤を比較した結果、分散剤の使い分けで、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。
- ③ 排泄の観点において、CURは、未変化体・代謝物とともに、既知経路である胆汁酸排泄のみならず、高吸収化体を活用したからこそ、尿中にも排泄されていることが提示
- ④ 毒性の観点において、老化によって、より高感度に非晶質CURの毒性を観察できると仮説したものの、本実験系では、安全性の高感度な評価指標を見出すことはできなかった。

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

## 別添 3

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「適切な分散剤の選択」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. [動態]と[水溶性・吸収性]の解析から、単に、水溶性を高めて、吸収性を亢進（AUCが大きい）させることだけではなく、その質（最高血中濃度や徐放性）を考慮し、高分子ポリマーや分散剤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るため、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、安全性評価においては、労力のかかる亜急性毒性試験（90日間の反復連日投与試験）や慢性毒性試験（12ヶ月間の反復連日投与試験）だけに頼るのではなく、MS4の蓄積性や、代謝や排泄の程度や速度を評価項目として理解することが、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。

※ これまでの行政評価でも指摘されている汎用性評価を見据え、CUR以外の成分への適用を試みた結果、同様の非晶質処方により、レスベラトロール/シリマリンも水溶性が向上することから、更なる検証は必要なものの、本事業の成果は、他成分に対しても適用できる可能性が提示された。

## 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，平井はるな，中村倫子，前北 光，中尾友洋，木下圭剛，坂田 慎，西野雅之，原田和生，平田收正，東阪和馬，堤 康央：高水溶性非晶質クルクミンの開発と水溶性向上機序の解析.，第24回日本食品化学学会.，東京（東京），2018年5月。
2. **長野一也**，武田真梨子，吉田卓也，平井はるな，中村倫子，前北 光，中尾友洋，木下圭剛，坂田 慎，西野雅之，原田和生，平田收正，東阪和馬，堤 康央：高品質な機能性食品の開発を目指した、非晶質クルクミン製剤の設計と水溶性・吸収性評価.，第65回日本食品科学工学会.，仙台（宮城），2018年8月。
3. 前北 光，**長野一也**，今川直樹，平井はるな，武田真梨子，中村倫子，中尾友洋，木下圭剛，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：新規非晶質クルクミンによる中性脂肪低下作用とその機構の解析.，日本薬学会第139年会.，幕張（千葉），2019年3月。

4. **長野一也**, 東阪和馬, 辻野博文, 平田收正, 堤康央: 高品質な機能性食品の開発を目指した、非晶質クルクミンの開発と評価., 日本薬学会第 139 年会, 千葉 (千葉), 2019 年 3 月. 【シンポジウム: 産学連携による機能性食品・機能性化粧品開発への若手の挑戦】
5. **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.
6. **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, 橋 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.
7. **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.
8. **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, 橋 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.
9. **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, 橋 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.
10. **長野一也**, 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: 新規高水溶性非晶質クルクミンの開発と抗酸化作用の解析., 第 26 回日本食品化学学会, 奈良 (奈良), 2020 年 9 月.
11. **長野一也**, 今川直樹, 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: クルクミンの水溶性向上が抗酸化機能に与える影響評価., 日本薬学会第 141 年会., 広島 (広島), 2021 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))
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))。

### ② 実用新案登録

該当なし。

### ③ その他

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

**研究成果の刊行に関する一覧表**

書籍：該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌：該当なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年