

**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。また、2年目では、アッセイ系の最適化とともに、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。さらに、本年度（3年目）では、以下の通り、品質に関わる知見や評価指標を引き続き抽出しつつ、対応策を含めた知見が収集できたため、目的とする「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に関するまとめ」を作成することができた。

- ① 「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 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 CURは、既知経路である胆汁酸排泄のみならず、尿中にも排泄されていることが提示
- ④ 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。

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

別添3

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**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) をクルクミン: 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)

実験動物

Sprague-Dawley rat (雄性) 及び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週齢にて実験を開始した。実験の前日には絶食させた。温度23℃、湿度55%、12時間ごとに明暗を繰り返した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は大阪大学動物実験規定に準じた。

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。

$$D = r^2 (t_2 - t_1) / 24 (\tau_2 - \tau_1)$$

(r : 毛細管半径、t : 温度、τ : ピーク幅)

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℃ 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℃ 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, 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%)

別添 3

LC-MS/MS 測定条件

| 項目 | 設定値 |
|---------|---|
| LC | |
| カラム | C18 カラム Waters (1.7 μ 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 μ 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 |

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 μ L 酢酸緩衝液 (pH 4)、 β -グルクロニダーゼを 25 μ 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-d₆ 溶液を 50 μ L を添加した。液液抽出のため、250 μ 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 μ 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 μ 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、 β -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。

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 μ m メンブレ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 μ m メンブレ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。

別添 3

(*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 μ L |
| 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、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。

平成30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、¹H-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⁻¹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。

そこで平成31/令和1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¹H-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。その結果、PGFEの配合によって、CURの結晶化に貢献しているCUR-CUR相互作用（ベンゼン環同士のπ-πスタッキングなど）が抑制されていることが明らかとなった。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。

そこで令和2年度(3年目)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 μm²/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 μm²/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ヨ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 μm²/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

別添3

装（アルミ蒸着袋など）」を考慮する必要を提示してきた。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が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) ¹H-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⁻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. 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

平成30年度(1年目)は、CURの静脈内投与後血中プロファイルから、2コンパートメントモデルに当てはまることを示し、吸収過程のみならず、消失過程も評価可能となり、様々な処方の動態学的因子を比

較するための基盤を構築してきた。また、平成31/令和1年度(2年目)には、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示してきた。

そこで令和2年度(3年目)は、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、既存の非晶質処方と比べて、高い水溶性を実現する分散剤：ショ糖脂肪酸エステルを配合した処方では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と比較して、ショ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、最高血中濃度（Cmax）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-3. 排泄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、「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

本マイルストーンでは、安全性に重要な代謝や排泄に着目して、その実態を明らかにする。

平成31/令和1年度(2年目)では、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その多くを占めている可能性を見出した。また、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いた。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。

そこで令和2年度(3年目)は、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CU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

別添 3

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-4. 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、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

平成 30 年度(1 年目)は、最も水溶性が高い非晶質 CUR 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、評価しやすい指標であることが示唆された。そこで、その詳細を解析するため、平成 31/令和 1 年度(2 年目)では、90 日間摂取させて評価したところ、特に、肝臓障害が評価しやすい指標であることが示唆された。その一方で、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、令和 2 年度(3 年目)は、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 CUR 配合食を 4 ヶ月間摂取させ、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。

別添 3

昨年度まで/本年度の成果、MS4・MS5の蓄積・代謝・排泄と組み合わせて考えると、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-5. 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、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

別添3

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，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。

2. 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

該当なし。

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

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。

別添 3

③ その他

該当なし。

尚、下記に本研究の協力研究者を列举する。

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