

## 学 位 論 文 題 名

機能性食品成分の体内動態特性を考慮した製剤開発に  
関する研究

## 学位論文内容の要旨

近年、我が国は、生活様式の多様化や食の欧米化に起因する糖尿病や脂質異常症をはじめとする生活習慣病の増加、高度高齢社会の進行などにより国民医療費が年々高騰している。これらの社会的背景から国民の健康の保持・増進のための様々な政策が提起されるとともに、「予防医療」の重要性が喚起されている。この予防医療の高まりを受け、体調調節作用、疾病予防を目的とした食品成分に関する研究が広く行われており、その成果を反映した多様な機能性食品が開発、利用されている。また、近年の我が国の三大死因は悪性新生物、心疾患、脳虚血性疾患であり、これらには活性酸素種(ROS)が深く関与している。ROS は、日常的に生体内で産生されているが、体内に備わるグルタチオンやビタミンC、ビタミンEなどの抗酸化系により消去される。しかしながら、炎症や種々の薬剤投与、特に虚血やストレスなどの状態において過剰にROSが産生された場合や体内の抗酸化系が破綻した場合には全てを消去できなくなる。その消去しきれなかったROSにより、脂質、タンパク質、核酸などが障害を受け、臓器レベルの機能が障害される。このようにROSは疾病形成に寄与すること、また前述の生活習慣病はこれらの三大死因に挙げられる疾患の発症リスクを数倍から数十倍も高めることも知られていることから、特に抗酸化作用を持つ機能性食品成分の摂取に注目が集まっている。しかしながらこのような成分は、食品であるがゆえに詳細な体内動態解析が行われていないものが多く、適正な使用法、効率的な摂取法などの科学的根拠は十分とは言えない。

そこで本研究は、抗酸化効果を持つ機能性食品成分のより適切な利用を目指した製剤開発に貢献することを目的として種々検討した。

はじめに、生体で酸化の影響を最も受けやすいとされる脂質に焦点を当て、抗酸化作用を持つ機能性食品成分が一連の酸化反応のどこに寄与しているのかを明らかにすることとした。具体的には、酸化反応の上流に位置するスーパーオキシドアニオンの消去作用をMPEC(2-methyl-6-p-methoxyphenylethynylimidazopyrazinone)の発光阻害作用を利用し、算出した $IC_{50}$ 値にて確認した。また、脂質の過酸化はラジカル連鎖反応により産生されることから、ORAC(oxygen-radical absorbance capacity)法を用いて評価した。さらに、酸化反応による最終産物である過酸化脂質をTBA(thiobarbituric acid)法により測定した。その結果、生体内抗酸化物質であるビタミンCなどと比較して、カロテノイドの一種であるルテインは、*in vivo*、*in vitro*のいずれにおいても非常に強力な抗酸化作用を有することが示された。ルテインは、目の黄斑部を形成している色素であり、その長期的な摂取が、近年急増する加齢黄斑変性症の発症リスクを低下させるとの報告があることから注目を集めている物質である。ルテインは、黄斑において上記のような強い抗酸化作用と有害な光線に対するフィルターとしての作用の二重の機能により眼を保護しているとされているが、体内動態に関する知見は非常に少ないのが現状である。このような抗酸化物質は標的とした臓器組織内に適切な濃度で存在することで効果を発揮できると考えられる。そこで、ルテインの生体内におけるより効率的な利用、効果発揮を目的として体内動態を詳細に検討した。

はじめに、ルテインの吸収動態を把握するために、バイオアベイラビリティを算出した。静脈内および経口投与時それぞれのAUC(area under the curve)を比較した結果、ルテインのバイオアベイラビリティは5.20%と算出され、吸収率が極めて低いことが明らかとなった。ルテインのような極めて脂溶性の高い物質が低い吸収率を示す要因として、物質そのものが持つ低溶解性と消化管における排出系トランスポータの関与が考えられる。これらのことを明らかにするため、ヒト

消化管モデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて検討を行った。ATP 枯渇剤を過剰に加えた場合、ルテインの細胞内取り込み量は変化しなかった。このことから、ATP を駆動力とする ABC トランスポーターなどの排出系の輸送担体の関与はないと考えられ、消化管における排出系トランスポーターはルテインの低い吸収性を示す要因ではないことが示唆された。また、近年、小腸においてコレステロールなどを取り込むトランスポーターとして NPC1L1(Niemann-Pick C1 Like 1)が同定され、ルテインの細胞内への取り込みにも関与している可能性が考えられたため NPC1L1 の選択的阻害剤であるエゼチミブを用いて検討を行った。その結果、ルテインの細胞内取り込み量は有意に減少し、ルテインの吸収にこのトランスポーターが関与していることが示唆された。また、ルテインの低吸収性を示す要因は、溶解性であり、溶解性を改善することが吸収改善につながると考えられた。続いて、脂溶性が高く、膜透過性が低いというルテインと同様の性質を持つ機能性食品成分の吸収を改善するために、乳剤化に焦点を当てて検討を行った。上記のような性質を持つルテイン、コエンザイム Q10 は BCS (biopharmaceutics classification system) クラス 4 に分類される機能性食品成分であり、吸収率が低いことが知られているため、これらの成分の吸収改善を目的として種々検討を行った。その結果、これらの成分は乳剤化することにより、吸収が改善することが示された。また、これらの成分は胆汁がない状態では、ほとんど吸収されなかったことから、基質となる成分を乳剤化し、さらに消化管において胆汁成分と混合することにより、吸収されやすくなることが示された。また、いくつかの性質の異なる界面活性剤を用いることで脂溶性物質の高い消化管吸収改善効果が得られることが示唆された。これらの成分は親水性の高い界面活性剤を用いることで、そのミセル形成作用により、脂溶性物質が溶解した油相を微細化し、より効率的かつ安定に非攪拌水槽を透過したことが消化管吸収増大の要因として考えられる。今後は、複数の界面活性剤を用いた場合などにおいて、どのように消化管吸収改善に寄与するのかさらなる検討が必要である。

これらの機能性食品成分の吸収改善に関する体内動態を考慮した情報を発信することにより、機能性食品のより適切な利用につながり、健康の維持・増進、疾病予防に寄与することが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	菅原	満
副査	教授	井関	健
副査	准教授	武隈	洋
副査	准教授	山口	浩明

## 学位論文題名

### 機能性食品成分の体内動態特性を考慮した製剤開発に関する研究

近年、健康増進や疾病予防を目的として、種々の機能性食品やその成分を主成分とするサプリメント等が利用されている。なかでも、種々の疾患の発症や進行に深く関与する活性酸素による酸化ストレスを低減する目的で抗酸化作用を有する機能性食品成分が注目されている。しかしながら、医薬品とは違い、機能性食品成分の体内動態や作用の詳細、効果的な製剤化に関する詳細な検討は行われていないことから、本研究ではこれらの点を明らかにすることを目的とした。

本論文では、抗酸化作用を有する物質のうち、溶解性や膜透過性が低いため経口吸収性が劣ると予想される化合物に焦点を当て、1) その抗酸化機構解明と動物実験による組織保護効果、2) 消化管吸収機構の解明、3) 吸収改善のための製剤学的検討について論じた。

はじめに、各種抗酸化物質の活性を同一条件で比較する方法を検討し、ORAC assay が脂溶性の異なる幅広い化合物の評価に適していることを明らかにした。また、動物実験により得られた *in vivo* での各種抗酸化物質による酸化障害抑制作用は、*in vitro* での検討結果とよく対応していた。なかでもルテインは非常に強力なラジカル連鎖反応抑制作用を持ち、組織保護効果も優れていることから、当該抗酸化物質を適切に作用部位へと送達させることができれば、十分にその作用を期待できることを示した。本評価法は、一連のラジカル反応における抗酸化物質の作用の強さや作用点を明らかにしたり予測したりする上で有用であると評価できる。

次に、抗酸化物質として優れた結果が得られたルテインに着目して、吸収機構に関する検討を行った。その結果、ルテインの低吸収性には排出系トランスポーターの関与はほとんど無く、一方、NPC1L1 や SR-B1 などの吸収方向のトランスポーターにより消化管腔から吸収細胞に取り込まれるものの、その低吸収性の主要な原因はその溶解性の悪さであることを明らかにした。本結果は、このような物質を効率良く吸収させるためには溶解性を

克服する必要があることを示しており、吸収改善のための戦略をたてる上で有用な知見である。

最後に、これまでの結果を踏まえて、吸収改善のための製剤学的検討を行った。ここでは、ルテインと同様な性質（低溶解性、低膜透過性）を有する物質への応用も考慮し、近年、医薬品開発に取り入れられている Biopharmaceutics Classification System (BCS) の概念を取り入れた乳剤化の検討を行った。その結果、ルテインのような BCS クラスⅣに属する物質では、主成分となる物質の溶解性が高い油相を選択し、親水性の高い界面活性剤を乳剤基剤として用いることにより吸収性が大きく改善されることを明らかにした。また、このように調製した乳剤であっても消化管内で胆汁が分泌されていないとその吸収増大効果は小さく、可溶化のみではなく胆汁と混合することが吸収増大に重要であることが明らかになった。以上の知見は抗酸化物質を含む BCS クラスⅣに属する機能性食品成分の吸収性を高めた製剤開発や改良のために有益なものと期待される。

発表会および口頭試問においては、当該物質あるいは製剤の消化管内での安定性や、リンパ移行の可能性、トランスポーターに認識される機構等について質問があり、申請者は自身の実験結果や文献情報を引用しながら的確に回答した。4人の審査担当者による審査の結果、本論文は学位論文の水準に達しており、申請者は博士（生命科学）を受けるに十分な知識と能力を有しているものと認めた。