

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790140

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Pharmaceutical development of functional food components based on pharmacokinetic properties

研究代表者

佐藤 夕紀(SATO, YUKI)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00564981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、機能性食品成分の消化管における吸収機構に関する検討、さらに乳剤化等による製剤学的な検討を行った。機能性食品成分であるルテインやCoQ10の消化管吸収にトランスポーターが関与していることが示された。また、乳剤の中の界面活性剤成分として親水性の高いものを用いるとより高い吸収改善効果が得られることが示唆された。今後はこれらの動態特性を生かして、より効率的な摂取法などの情報発信、吸収改善・効果改善のためのより適切な製剤を開発してゆく。

研究成果の概要(英文)：Preventive medicine and anti-aging medicine have received much attention recently due to increases in the proportion of elderly people in the population and patients with lifestyle diseases. We investigated the absorption mechanism of lutein, a functional food component, in detail. Ezetimibe, an inhibitor of NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1), inhibited up to 40% of lutein accumulation by Caco-2 cell monolayers. Our results showed that lutein absorption is, at least in part, mediated by influx transporter NPC1L1. We then prepared some emulsions and investigated the effect the improvement the absorption. Our study suggests that Bile and emulsion formulation are essential for absorption of Coenzyme Q10 (CoQ10), a lipophilic food component. Highly lipophilic compounds like CoQ10 would diffuse the unstirred water layer and would easily access the intestinal apical membrane by an emulsion containing a surfactant with a high HLB (hydrophile lipophile balance)value.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬学 薬剤学 トランスポーター 乳剤 機能性食品成分 吸収改善 小腸

1. 研究開始当初の背景

小腸からの吸収過程は、成分が生体へと侵入する第一段階であり、トランスポータをはじめ様々な動態関連因子により制御されている。従来、コレステロール(chol)のような脂溶性の高い物質は、胆汁などの生体成分により乳化され、受動拡散により吸収されると考えられてきたが、小腸 chol トランスポータとして NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1) が 2004 年に発表されて以来、SR-B1 (Scavenger receptor class B type 1) 等を含めた特殊な機構により吸収されていることが明らかになってきた[Altmann S. W., et al., Science, (2004); Cai S. F., et al., J Lipid Res, (2001)]. NPC1L1 や SR-B1 は、消化管管腔側に発現するタンパク質であり、chol をはじめとする様々な脂溶性物質の細胞内取り込みに関与していることが報告されている [During A., et al., J Nutr, (2005); Narushima K., et al., Pharm Res, (2008)]. このような物質の中でも、脂溶性食品成分に関しては、その構造上これらのトランスポータ等を介した特殊な輸送機構により吸収されることが予想されるが、食品成分であるがゆえに詳細な体内動態に関する検討は十分に行われて来なかったのが現状である。食品成分の吸収機構が明らかになり、動態特性を生かしてどのようにその吸収を改善できるかを示すことができれば、これらの成分をサプリメントなどで漫然と摂取し続けるのではなく、科学的根拠に基づいたより効率的な摂取法、さらに医薬品などとの注意すべき相互作用などの情報も発信できると可能性がある。本申請研究から得られる知見により、国民のさらなる健康維持・増進、生活習慣病をはじめとする疾病予防に寄与することで社会に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本申請研究では、低吸収性を示す機能性食品成分に焦点を当て、それらの消化管における吸収機構に関する検討、さらに乳剤化などの製剤開発・トランスポータを利用した吸収改善のための検討を行うことで、吸収動態特性を考慮した吸収改善理論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

当研究室ではこれまでに機能性食品成分である消化管吸収に関して検討を進めてきた。その中でも消化管吸収率の極めて低い機能性食品成分としてルテインや Coenzyme Q10 (CoQ10) に着目した。これらの物質は非常に脂溶性が高いため、乳剤化して実験に用いることとした。

(1) 細胞内取り込み量での評価

消化管モデルとして汎用されているヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を用いて、ルテインや CoQ10 を種々の条件下で取り込ませ、その取り込み量は HPLC 法により定量した【Sato Y., et al., Biopharm Drug Dispos., 32, 151-158 (2011), Sato Y., et al., Biol. Pharm. Bull., 36, 2012-2017 (2013)】。

(2) 実験動物への投与による血漿中濃度推移への影響

調製した乳剤が吸収改善されるか否かを明らかにすべく、Wistar 系雄性ラットを用いて、ルテインまたは CoQ10 乳剤の経口投与後、経時的に採血し、すぐにヘパリンナトリウムと混合し、遠心分離後、血漿サンプルを得た。その血漿サンプルから、抽出操作などを経て、HPLC 法により定量し、血漿中濃度推移を求めた。さらに必要に応じて、血漿中濃度推移から AUC (area under the curve) 等の動態学的パラメータを算出した。

(3) 乳剤の取り込み挙動の評価

乳剤の構成成分である界面活性剤の蛍光色素標識体 LPC-BODIPY を用いて、消化管上皮モデルとして汎用される Caco-2 細胞内の取り込み量をフローサイトメトリー (FACS) により測定した。

4. 研究成果

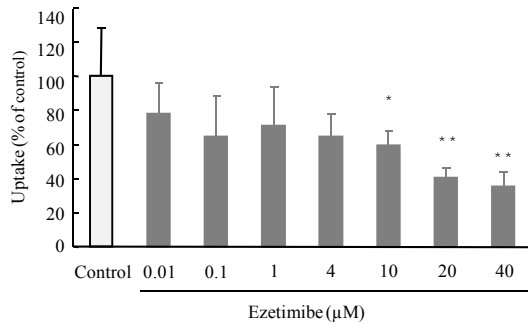
(1) ルテインの消化管細胞内取り込みにおけるトランスポータ NPC1L1 の関与

これまでに申請者らはルテインの消化管吸収率が約 5%程度と非常に低いことを明らかにしている【Sato Y., et al., Biopharm Drug Dispos., 32, 151-158 (2011)】。この低い消化管吸収率に関して、ルテインの消化管吸収機構をより詳細に明らかにすべく、Caco-2 細胞を用いて検討を行った。

はじめに P-gp (P-glycoprotein) 等の排出系トランスポータの関与を考え、ATP 枯渇剤等で処理した後のルテインの細胞内取り込み量を検討した。その結果、取り込み量は有意には変化せず、ルテインの消化管細胞内取り込みにおける排出系 ABC トランスポータの関与は低いことが示唆された (データは示していない)。

一方で、ルテインは非常に高い脂溶性を持つ成分であることから、コレステロールと類似した挙動を示すのではないかと仮説を立て、NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブを用いた場合の取り込み量を比較した。その結果、ルテインの細胞内取り込みは、エゼチミブ 25 μM まで有意に減少し、その取り込みに一部 NPC1L1 が関与していることが示された (図 A)

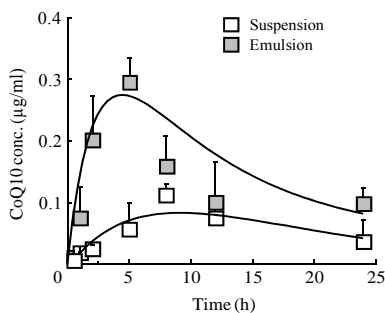
【Sato Y., et al., J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 15, 256-264 (2012)】。



図A ルテインのCaco-2細胞内取り込みにおけるエゼチミブの阻害効果

(2) CoQ10 の乳剤化による消化管吸収改善 乳剤化による吸収改善

続いて、非常に脂溶性の高いことが知られている CoQ10 に関して、経口吸収率の改善を目的として、乳剤を実験動物へ経口投与した後の血漿中濃度推移を求め、吸収改善効果を確認することとした。その結果、原末投与群ではほとんど吸収されなかったのに対し、乳剤投与群では高い血漿中濃度を示した(図 B)。

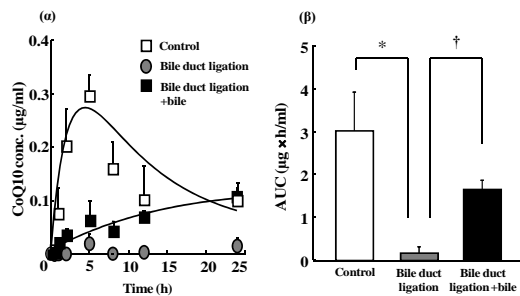


図B 剤形を懸濁剤と乳剤として経口投与した場合の CoQ10 の血漿中濃度推移

乳剤投与後の血漿中濃度推移に与える胆汁の影響

前項の乳剤投与による吸収改善に関して、CoQ10 は小腸において胆汁などによりさらに吸収されやすくなっていると考えられるが、乳剤を投与した時の胆汁の影響は明らかではない。そこで、胆管を予め結紮し、そこへ乳剤を投与した時の血漿中濃度を検討した。その結果、続いて、非常に脂溶性の高いことが知られている CoQ10 に関して、経口吸収率の改善を目的として、乳剤を実験動物へ経口投与した後の血漿中濃度推移を求め、具体的に吸収改善効果を数値化することを試みた。その結果、剤形を乳剤としても胆汁が無ければほとんど吸収されないことが示された。また、胆管を結紮したラットへ別のラットから採取した胆汁を投与したあとの CoQ10 乳剤の血漿中濃度推移は、胆管結紮群と比較して有意に高かったことから、CoQ10 のような脂溶性の高い物質の吸収において、胆汁は極めて重要な役割を果たしていることが示された

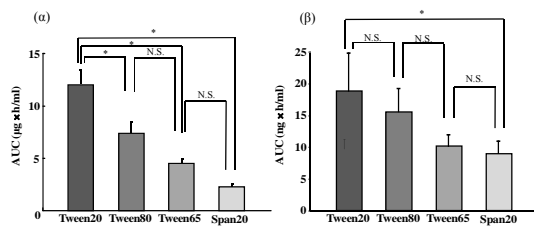
(図 C) 【Sato Y., et al., Biol. Pharm. Bull., 36, 2012-2017 (2013)】。



図C 胆管結紮ラットへのCoQ10乳剤経口投与後の血漿中濃度推移(a)とAUC(β)

(3) ルテイン・CoQ10 の最適な乳剤組成の検討

また、これまでに剤形を乳剤とすることでルテインや CoQ10 を吸収改善できることが示された。続いて、乳剤の最適化を目標としてこの乳剤組成の中でも界面活性剤成分に着目して検討を行った。その結果、界面活性剤として用いた Tween20, Tween80, Tween65, Span20 のうち、Tween20 を含む乳剤において、最も高い血漿中濃度推移、AUC が得られた。界面活性剤の性質を表す HLB (hydrophile lipophile balance) 値が大きいものほど、今回高い AUC が得られたことから、親水性の高い界面活性剤を用いることで、胆汁などと混合ミセルを形成することにより、脂溶性成分を微細化し、HLB 値の低い界面活性剤を用いた場合よりも、効率的かつ安定的に小腸非攪拌水槽の透過を促進したことが吸収性の向上の理由として考えられる。今後はオイル成分などにも注目して、より検討を進める必要があると考えている(図 D)【Sato Y., et al., Biol. Pharm. Bull., 36, 2012-2017 (2013)】。



図D 界面活性剤成分を変更して調製したCoQ10(a)とルテイン(β)の乳剤経口投与後の血漿中濃度推移から算出されるAUC

(4) NPC1L1 を含む乳剤の取り込み挙動の評価

これまでにルテインは一部 NPC1L1 を介して細胞内に取り込まれることが示唆されている。乳剤中の NPC1L1 の基質となる成分はどのように取り込まれているのかをより詳細に明らかにする目的で、乳剤自体の取り込み挙動を FACS にて評価することとした。

NPC1L1 の基質として chol を含むミセルと比較して、chol を含まないミセルの蛍光物質質量 (Geo Mean 値) は有意に減少した。また、chol を含むミセルにエゼチミブをブレインキューベーションすることにより、その取り込み量は有意に減少したことから、界面活性剤成分は NPC1L1 が基質を取り込む際に同時に取り込まれることが示唆された【論文投稿中】。

【今後の展望】

NPC1L1 の基質である chol を乳剤に組み込むことにより、NPC1L1 の基質ではない物質も吸収改善できることが示され、NPC1L1 は難水溶性物質の吸収を向上させる有用なトランスポーターであることが示唆された。本申請研究で得られた成果を元に、若手研究 B【H26～27 年『低吸収性を示す機能性食品成分の吸収改善と動態特性を考慮した製剤開発』】が採択され、現在鋭意遂行中である。今後は、*in vivo* レベルでも検討を行い、さらに他の物質でも同様の傾向が見られるか否か検討する必要がある。また、現段階では NPC1L1 の基質ではない物質としてレチノール(ビタミン A) が報告されているため、こちらを用いて、同様の検討を行ってゆく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Sato Y., Mutoh H., Suzuki M., Takekuma Y., Iseki K., Sugawara M. Emulsification using highly hydrophilic surfactants improves the absorption of orally administered coenzyme Q10. *Biol. Pharm. Bull.*, 36, 2012-2017 (2013). 査読あり
2. Sato Y., Kondo Y., Sumi M., Takekuma Y., Sugawara M. Intracellular uptake mechanism of lutein in retinal pigment epithelial cells. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 16, 494-501 (2013). 査読あり
3. Sato Y., Suzuki R., Kobayashi M., Itagaki S., Hirano T., Noda T., Mizuno S., Sugawara M., Iseki K. Involvement of cholesterol transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in the intestinal absorption of lutein. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 15, 256-264 (2012). 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 佐藤夕紀, 能登数馬, 竹川悠人, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. Coenzyme Q10 の消化管吸収改善. 日本コエンザイム Q 協会 第 11 回研究会. 2014 年 1 月 28 日. 東京工科大学 (東京都).
2. 竹川悠人, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. 乳剤化による難吸収性物質の吸収改善～コレステロール輸送担体 NPC1L1 の利用～. 第 23 回 日本医療薬学会年会. 2013 年 9 月 21～22 日. 仙台国際センター等 (宮城県).
3. 佐藤夕紀. 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. 第 23 回 日本医療薬学会年会. 2013 年 9 月 21～22 日. 仙台国際センター (宮城県)【招待講演】.
4. 星山博俊, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. 難吸収性ポリフェノールの乳剤化によるバイオアベイラビリティ改善. 第 27 回 北海道薬物作用談話会. 2013 年 7 月 20 日. 酪農学園大学 (北海道).
5. 佐藤夕紀. ルテインの機能性とその活用について. 第 4 回 「食と健康」研究会. 2013 年 7 月 3 日. 北海道大学 (北海道)【招待講演】.
6. 佐藤夕紀, 近藤有, 武隈洋, 菅原満. 黄斑色素成分ルテインのヒト網膜上皮細胞内への取り込み機構の解明. 日本薬剤学会年会 第 28 年会. 2013 年 5 月 23～25 日. 愛知県産業労働センター ウィンクあいち (愛知県).
7. 竹川悠人, 佐藤夕紀, 鷺見正人, 武隈洋, 菅原満. Niemann-Pick C1 Like-1 (NPC1L1) を介した難吸収性物質の吸収改善へのアプローチ. 日本薬学会北海道支部第 140 回例会. 2013 年 5 月 18 日. 札幌コンベンションセンター (北海道).
8. 能登数馬, 佐藤夕紀, 武隈洋, 菅原満. 粒子径に着目した CoQ10 の乳剤化による吸収改善. 日本薬学会北海道支部第 138 回例会. 2012 年 6 月 16 日. 札幌コンベンションセンター (北海道).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/doutai/index.html>

ヘルスイノベーションカレッジ：

「さっぽろヘルスイノベーション
'Smart-H」事業（2012年7月開始）の一環
として、同年10月より「ヘルスイノベー
ションカレッジ」が開講されている。申請者は
ベーシック・プログラムの講義の一コマを担
当しており、医療関係者、管理栄養士等を中
心とする食の機能と健康、またその商品開発
に関心のある方々などへ本申請研究の内容
を一部含めた情報発信を行っている。

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 夕紀（SATO Yuki）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00564981

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし