

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460235

研究課題名(和文)ポリフェノール類の生体内での酸化抑制効果の比較とポリフェノール含有新規製剤の開発

研究課題名(英文) Comparison of in vivo antioxidant effect of polyphenols and development of novel formulations containing polyphenol

研究代表者

池内 由里(高橋由里)(Ikeuchi-Takahashi, Yuri)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10339525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病マウスにポリフェノールを腹腔内投与した結果、モリンにおいて強い脂質過酸化抑制効果がみられた。モリンは脂質の過酸化に関連する疾患に有用となる可能性があるが、吸収性が極めて低いことから、吸収性の向上を目的に、モリン封入固体脂質微粒子(SLN)の開発を行った。基剤にハードファットを用い、エチルセルロースおよび低けん化度ポリビニルアルコールを添加したSLNを調製した。SLNをマウスに経口投与した結果、モリン原末の投与と比較して薬物吸収性が向上した。さらに、モリン含有ナノエマルジョンの開発を行った。調製したエマルジョンをマウスに経口投与したときの薬物吸収性は、モリン原末投与と比較して増加した。

研究成果の概要(英文)：As a result of intraperitoneal administration of polyphenols to diabetic mice, a strong inhibitory effects on lipid peroxidation was observed in morin. Morin may be useful for relief from complaints related to lipid peroxidation, but because of its extremely low bioavailability, we developed solid lipid nanoparticles (SLN) for the purpose of improving bioavailability. SLN was prepared using hard fat as a base with ethylcellulose and low saponification-degree polyvinyl alcohol. As a result of oral administration of the SLN to mice, drug absorption was improved as compared with administration of morin bulk powder. Furthermore, we developed nanoemulsions containing morin. As a result of oral administration of the prepared nanoemulsion to mice, drug absorption was increased as compared with the administration of morin bulk powder.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：ポリフェノール 過酸化脂質 モリン 固体脂質微粒子 生物学的利用率 エマルジョン

### 1. 研究開始当初の背景

生体内で発生する安定的な対の電子を持たない不対電子を持つ分子又は原子であるフリーラジカルは、酸化が生体の抗酸化機構より優位となる酸化ストレス状態において、脂質、タンパク質、DNA などを含む生きている細胞を攻撃して電子を獲得し、安定化を図る機序がある。それが原因で、癌、アテローム性動脈硬化症などの発症や老化が促進されることが指摘されている。酸化ストレス状態において最も酸化されやすい生体成分は脂質であり、LDL 中の不飽和脂肪酸が酸化した酸化変性 LDL が、動脈硬化の発症・進展に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。ポリフェノール類は、豆や野菜、果物など多くの食物に含まれる種類が豊富な成分であり、生体の酸化に関連する疾病においてその予防作用が期待されている。しかしながら、一般的にポリフェノール類においては、経口投与では生物学的利用率が低いことから、脂質の過酸化に関連する動脈硬化などの疾患の予防および治療に有効なポリフェノールの経口投与における吸収性を高めた新規製剤が望まれている。

### 2. 研究の目的

(1) 生体内の不飽和脂肪酸は、酸化ストレス状態において容易に酸化され、その結果として過酸化脂質が生成される。過酸化脂質は、老化や動脈硬化などの原因の一つとして注目されており、糖尿病患者においても血中過酸化脂質が高値を示すとの報告がある。<sup>1)</sup>そこで、糖尿病モデルマウスにおける脂質過酸化に対するポリフェノール類の酸化抑制作用について評価する。

(2) フラボノイド系ポリフェノールであるモリン (MO) は、脂質の過酸化に関連する動脈硬化症などの疾患に対して有用となる可能性が考えられるが、難水溶性、P 糖蛋白の基質となる、腸管透過性が低いなどの理由から、生物学的利用率が極めて低いことが指摘されている。そこで、MO の生物学的利用率を高めることを目的に、MO 封入固体脂質微粒子 (SLN) および MO 含有ナノエマルジョンを新規に開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 特性の異なるポリフェノールである MO、クロロゲン酸 (CA)、レスベラトロール (RV) を用い、それらのポリフェノールを 1 型糖尿病モデルマウスに 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与し、生体内における脂質過酸化抑制効果について比較した。さらに、ポリフェノールを 1 型糖尿病モデルマウスおよび正常マウスに単回腹腔内投与したときの血漿中および肝臓中薬物濃度について測定した。

(2) MO は、糖尿病モデルマウスにおいて優れた脂質過酸化抑制作用を示したことから、MO

の消化管吸収性を高めるため、MO を SLN に封入した製剤を調製し、その製剤特性および MO の消化管吸収性について評価した。SLN の基剤としてハードファットを用い、界面活性剤としてポリソルベート 60 (Tween60) およびポリビニルアルコール (PVA) を用いた。さらに、エチルセルロース (EC) を添加した SLN も調製した。けん化度および粘度の異なる PVA を用い、特性値の異なる PVA が SLN の製剤特性および薬物吸収性に及ぼす影響について評価した。さらに、MO 含有ナノエマルジョンを調製し、その製剤特性および MO の消化管吸収性について評価した。ナノエマルジョンの分散相として中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) を用い、O/W 型エマルジョンを調製した。界面活性剤として Tween60 および PVA を用いた。

### 4. 研究成果

(1) ICR 系雄性マウスの尾静脈内にストレプトゾトシン (STZ、200 mg/kg) を投与することにより、1 型糖尿病モデルマウスを作製した。STZ 投与 12 週間後に、各ポリフェノール溶液 (6 µg/mL) を 1 日 1 回 5 日間連続で腹腔内投与した。腹腔内投与最終日の翌日に肝臓を摘出した。肝臓における脂質過酸化の程度は、チオバルビツール酸反応物質法を用いて、マロンジアルデヒド (MDA) 量を測定することで評価した。その結果を図 1 に示す。STZ を投与していないコントロール群における肝臓の MDA 値は、STZ を投与し、ポリフェノールを投与していない STZ 群に比べて有意に低いことが明らかとなった。CA 投与群における肝臓の MDA 値は、STZ 群に比べて低くなる傾向がみられたが、有意差はみられなかった。RV 投与群および MO 投与群における肝臓の MDA 値は、STZ 群に比べて有意に低いことが示された。

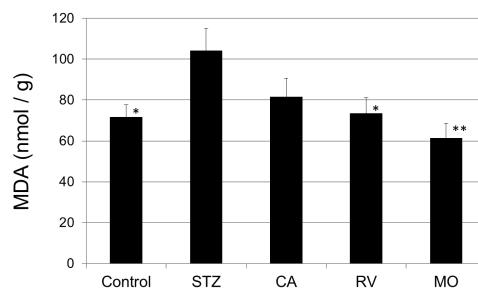


図1 各ポリフェノールを投与した 1 型糖尿病モデルマウスの肝臓における MDA 値

(2) STZ を投与してから 12 週間後のマウスに、各ポリフェノール溶液を 30 µmol/kg の用量で単回腹腔内投与した。また、正常マウスとして 6 週齢の ICR 系雄性マウスに、各ポリフェノール溶液を 30 µmol/kg の用量で単回腹腔内投与した。ポリフェノール投与後、15、30、45、60、120 分に血液および肝臓を採取し、血漿中および肝臓中薬物濃度を測定した。

1 型糖尿病モデルマウスおよび正常マウスのいずれにおいても、MO および CA を投与したときの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_p$ ) は同程度であったが、RV を投与したときの  $AUC_p$  は低い値となった。また、いずれのポリフェノールにおいても、正常マウスに比べて糖尿病モデルマウスにおいて、 $AUC_p$  が低い値となる結果が得られた。肝臓中薬物濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_l$ ) については、RV および CA を投与したときに同程度で低い値となり、MO を投与したときに高い値となった。また、いずれのポリフェノールにおいても、正常マウスに比べて糖尿病モデルマウスにおいて、 $AUC_l$  が低い値となる結果が得られた。以上の結果から、MO が肝臓の MDA 値を有意に低下させた理由の一つとして、肝臓において高い MO 濃度が維持されていたことが考えられた。

(3) MO が糖尿病マウスの肝臓における過酸化脂質を有意に低下させたことから、MO の消化管吸収性を改善することを目的に、MO 封入 SLN を調製した。固体脂質としてハードファットを用い、薬物放出抑制のため、ハードファットに EC を添加した製剤についても調製した。界面活性剤として Tween60 および PVA を用いた。PVA の特性が SLN の製剤特性に与える影響について評価するために、特性の異なる 3 種類の PVA (EG-05P, EG-18P, KL-03) を用いて SLN を調製し、PVA 添加量が SLN の製剤特性に及ぼす影響についても評価した。さらに、EC および低けん化度 PVA (LL-810) を添加した SLN についても調製した。EC を添加していない製剤においては、PVA 添加量を増加しても、封入効率に有意な差はみられなかった。EC を添加した製剤においては、PVA を増加すると封入効率は増加した。EC を添加した製剤においては、粘度の低い PVA を用いると封入効率が上昇する結果が得られた。SLN の粒度分布の測定においては、EC を添加していない製剤では、比較的けん化度の低い PVA (KL-03) において再現性の良い粒度分布が得られた。EC を添加した製剤では、比較的けん化度の高い PVA (EG-05P) において再現性の良い粒度分布が得られた。また、PVA (EG-05P) を用い、EC および PVA (LL-810) を添加した SLN についても再現性の良い粒度分布が得られ、その平均径は、 $0.518 \pm 0.075 \mu\text{m}$  (平均 $\pm$ SD,  $n=3$ ) となった。以上より、最適な PVA を用いることで、再現性の良い粒度分布を示す SLN が調製できることが示唆された。SLN からの薬物放出性を透析膜法により測定した結果、MO エタノール溶液と比べて、SLN では薬物放出が抑制された。MO 懸濁液と比較すると、EC を添加していない製剤ではわずかに速い放出がみられ、EC を添加した製剤では徐放性となった。さらに、PVA (EG-05P) を用い、EC および PVA (LL-810) を添加した SLN では、より徐放性となった。

(4) 粒度分布の測定において再現性の良い結果の得られた SLN について、in vivo 実験を行った。実験動物には ICR 系の雄性マウス (6 週齢) を用い、MO として 10 mg/kg の用量で単回経口投与を行った。SLN との比較のため、1 %CMC ナトリウム水溶液に MO を懸濁した溶液 (1.5 mg/mL) を調製し、同様に単回経口投与を行った。絶食下で経口投与を行った後、15、30、45、60、120、360 分の時点で血液を採取した。血漿中の MO 濃度は HPLC を用いて測定した。SLN を投与した群の  $C_{\text{max}}$  は、MO 懸濁液投与群と比べて高くなった。PVA (EG-05P) を用い、EC および PVA (LL-810) を添加した SLN において最も高い  $C_{\text{max}}$  がみられ、MO 懸濁液と比較して、 $C_{\text{max}}$  が 4.5 倍、AUC が 3 倍高くなった。

(5) MO の経口投与における生物学的利用能を高める製剤の開発を目指して、MO を含有するエマルジョンの製剤設計を行った。エマルジョンの分散相として中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) を用いた。界面活性剤として Tween 60 および PVA を用いた。けん化度および重合度の異なる PVA を用い、それらの PVA が製剤 (MCT エマルジョン) の特性に及ぼす影響について評価した。さらに、低けん化度 PVA (LL-810) を追加した製剤 (MCT-LL810 エマルジョン) も調製し、製剤特性について評価した。また、Tween 60 の添加量を減少させたエマルジョンも調製し、Tween 60 の必要最小量について評価した。PVA 特性はミセルの粒度分布の再現性およびゼータ電位には大きく影響しないが、ミセルの粒子径に影響を及ぼすことが示唆された。MCT エマルジョンおよび MCT-LL810 エマルジョンのいずれにおいても、重合度の高い PVA を用いることで粒子径の小さいミセルとなることが示された。Tween 60 の添加量については、MCT エマルジョンに比べ、MCT-LL810 エマルジョンにおいて、より少ない添加量でミセルを安定化できる可能性が示された。調製したエマルジョン中のミセルのメディアン径は 300-400 nm であり、ゼータ電位は -30 mV 程度であった。ICR 系の雄性マウス (6 週齢) に MO 含有 MCT エマルジョン、MO 含有 MCT-LL810 エマルジョンあるいは MO 懸濁液を絶食下、単回経口投与し、15、30、45、60、120、360 分後に血液を採取し、血漿中 MO 濃度を測定した結果、MO 懸濁液と比較して MO 含有 MCT エマルジョンを投与したときの薬物吸収性は増加した。しかしながら、SLN とエマルジョンを比較すると、SLN においてより吸収性が高くなったことから、MO の消化管吸収性を高める製剤としては SLN の方がより有用である可能性が示された。

#### < 引用文献 >

菅原 啓、依田 敏行、平田 徹、後藤 由夫、糖尿病、24 巻、1981、891-896

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5件)

池内 由里, 大西 啓, ポリフェノールを含有するエマルジョンの製剤設計, 日本健康医療学会雑誌, 4(2), 2016, 30-38 査読有  
<http://www.nihonkenkouiryoku.jp/>

Ikeuchi-Takahashi Y., Ishihara C., Onishi H., Formulation and evaluation of morin-loaded solid lipid nanoparticles, Biol. Pharm. Bull., 39, 2016, 1514-1522 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b16-00300

池内 由里, 小林 恒雄, 田口 久美子, 大西 啓, シス型およびトランス型脂肪酸における脂質過酸化とポリフェノールによる脂質過酸化抑制効果, 日本健康医療学会雑誌, 3(2), 2015, 27-34 査読有  
<http://www.nihonkenkouiryoku.jp/>

池内 由里, 小林 恒雄, 田口 久美子, 大西 啓, 1型糖尿病モデルマウスにおけるポリフェノールの脂質過酸化抑制効果, 日本健康医療学会雑誌, 3(2), 2015, 35-42 査読有  
<http://www.nihonkenkouiryoku.jp/>

Taguchi K., Hida M., Matsumoto T., Ikeuchi-Takahashi Y., Onishi H., Kobayashi T., Effect of short-term polyphenol treatment on endothelial dysfunction and thromboxane A<sub>2</sub> levels in streptozotocin-induced diabetic mice, Biol. Pharm. Bull., 37, 2014, 1056-1061 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b14-00157

〔学会発表〕(計8件)

池内 由里, 寒川 瑠子, 石原 千津子, 大西 啓, 日本薬剤学会第31年会, 2016年5月19-21日, 岐阜県・岐阜市, モリン封入固体脂質微粒子製剤の開発  
村井 万莉菜, 池内 由里, 石原 千津子, 大西 啓, 第25回日本医療薬学会年会, 2015年11月21-23日, 神奈川県・横浜市, モリンの生物学的利用能の向上を目指したエマルジョン製剤の開発  
寒川 瑠子, 池内 由里, 石原 千津子, 大西 啓, 第25回日本医療薬学会年会, 2015年11月21-23日, 神奈川県・横浜市, 難水溶性抗酸化物質であるモリンの生物学的利用能の向上を目指した製剤の開発

池内 由里, 大西 啓, 第8回日本健康医療学会, 2015年10月25日, 東京都・千代田区, シス型およびトランス型脂肪酸における脂質過酸化とポリフェノールによる脂質過酸化抑制効果  
井上 光月, 池内 由里, 笹津 備尚, 大西 啓, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25-28日, 兵庫県・神戸市, 糖尿病モデルマウスにおけるポリフェノール類の酸化抑制作用の比較  
片山 創太, 池内 由里, 仁賀 萌奈美, 笹津 備尚, 大西 啓, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25-28日, 兵庫県・神戸市, 難水溶性薬物を含有する固体脂質微粒子製剤の開発  
仁賀 萌奈美, 池内 由里, 第7回日本健康医療学会, 2014年12月7日, 千葉県・浦安市, 難水溶性薬物を含有する固体脂質微粒子製剤の開発  
池内 由里, 第7回日本健康医療学会, 2014年12月7日, 千葉県・浦安市, 糖尿病モデルマウスにおけるポリフェノール類の酸化抑制作用の比較

6. 研究組織

(1)研究代表者

池内 由里 (IKEUCHI-TAKAHASHI, Yuri)  
星薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号: 10339525

(2)連携研究者

小林 恒雄 (KOBAYASHI, Tsuneo)  
星薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90339523

大西 啓 (ONISHI, Hiraku)  
星薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00160565

(3)研究協力者

田口 久美子 (TAGUCHI, Kumiko)  
石原 千津子 (ISHIHARA, Chizuko)  
仁賀 萌奈美 (NIGA, Monami)  
片山 創太 (KATAYAMA, Sota)  
井上 光月 (INOUE, Mizuki)  
寒川 瑠子 (KANGAWA, Yoko)  
村井 万莉菜 (MURAI, Marina)