

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11578

研究課題名（和文）NAFLD/NASHの予防に向けた難水溶性ポリフェノール非晶質体の作製とその評価

研究課題名（英文）Preparation and evaluation of amorphous of poorly water-soluble polyphenols for prevention of NAFLD / NASH

研究代表者

石本 憲司 (Ishimoto, Kenji)

大阪大学・大学院薬学研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：00572984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、世界中で急速に増加している非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の予防策の一環として、ポリフェノール（Pol）の活用が求められている。しかし、Polが難水溶性であるため、その有効性が十分に発揮できないという問題が挙げられる。本研究では、独自に開発した製剤技術によって、難水溶性Polであるシリビニン（SLB）を非晶質化した。このSLB非晶質体は、水溶性や体内吸収性が大幅に改善し、更にはNAFLDに対する有効性を示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLD / 非アルコール性脂肪性肝疾患（NASH）は、放置すると肝硬変、更には肝臓癌をも発症する病態である。NASHは世界人口のほぼ6.5%が罹患しており、現在のところ有効な治療選択肢は存在しない。即ち、NAFLD/NASHの発症を未然に防ぐ方策を提供することが喫緊の課題となる。本研究成果は、健康食品やサプリメントとして利用可能な機能性食品成分であるポリフェノール（Pol）に着目し、その高機能化を達成した。従って、この高機能化Polを日常的に利用することで、NAFLD/NASHの予防効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, polyphenols (Pol) have been required to be utilized as part of preventive strategies for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a rapidly increasing disease worldwide. However, the problem is that Pol is poorly water-soluble, and its effectiveness cannot be fully exerted. In this study, we have amorphized silibinin (SLB), a poorly water-soluble Pol, using a formulation technology that we originally prepared. This amorphized SLB has greatly improved water solubility and gastrointestinal absorption, and has also shown efficacy against NAFLD.

研究分野：薬物動態学、製剤学

キーワード：ポリフェノール 非晶質固体分散体 NAFLD/NASH シリビニン ナリングニン 難水溶性 機能性食品
開発 予防戦略

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、アルコールを原因としない脂肪肝である非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発生率が世界中で急速に増加している。従来 NAFLD は、肝臓に脂肪が沈着しているだけの単純な脂肪肝と捉えられ、特に問題視されていなかった。しかし最近になって、NAFLD の中に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) という、放置すると肝硬変、さらには肝臓癌をも発症する病態が含まれていることが明らかとなってきた。NASH は世界人口のほぼ 6.5% が罹患しており、現在のところ有効な治療選択肢は存在しない。また NASH は、大部分の患者さんが無症候性であるという問題を抱えている。言い換えると、症状が明らかになった時点では、すでに疾患が進行していると考えられ、深刻な転帰を伴う恐れがある。患者さん自身が早い段階で気づくこと、そして治療法を発見すること、という 2 つの超えるべき大きなハードルをもつ NASH 治療において、その薬物療法戦略を提唱することは自明のことだが、それ以上にこの疾患の発症を未然に防ぐ方策を提供することが喫緊の課題である。

NAFLD/NASH の予防策の一環として、日頃の食生活の中に健康食品やサプリメントなどを合理的に取り入れて、未病の段階から対応することが好手と考えられる。中でも機能性成分であるポリフェノールを含むサプリメント等の利用は、NAFLD/NASH 予防に有効と考えられる。一方でポリフェノールは水溶性が低いため、それに起因した体内吸収性が非常に低い。そのため、ポリフェノールの有効な効果を得るためには、大量のポリフェノールが必要となり、現実的な利用を考えた場合、サプリメントの大型化や原材料の大量使用による高コスト化といった問題が生じる。従って、これらの問題を克服した NAFLD/NASH を予防できる高機能性な健康食品の開発することが望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発した製剤技術を用いて水溶性・体内吸収性に優れたポリフェノール非晶質体を作製することで、低用量かつ低コストで NAFLD/NASH を予防できる高機能性健康食品を創出するための基盤構築を目指す。また、我々の社会で次の慢性疾患の 1 つとされる NASH の予防戦略を提示することを通じて、セルフメディケーションを推進する国策にも貢献する。

3. 研究の方法

これまでに我々は、ほぼ水に不溶性 β -カロテン (カロテノイド骨格、化学式 $C_{40}H_{56}$) を可溶化する独自の非晶質固体分散体技術を開発した。具体的には、 β -カロテンに対して、水溶性ポリマーと乳化剤の三成分を混合後、高温で混練することで、非常に安定な非晶質体を作製する手法である (図 1)。本手法で作製した非晶質 β -カロテンは水溶性や体内吸収性が大幅に改善することを実証している。そこで本研究では、炭素と水素から構成される β -カロテンで確立した非晶質化技術を基盤とし、ベンゼン環に 2 個以上の水酸基を持つ化合物であるポリフェノールに適用することで、難水溶性を克服したポリフェノール非晶質体を作製できるか検証する。また、この非晶質体の体内動態や安全性、そして NAFLD/NASH に対する有効性評価を実施することで、低用量かつ低コストで NAFLD/NASH を予防できる高機能性健康食品開発に向けた基盤を構築する。

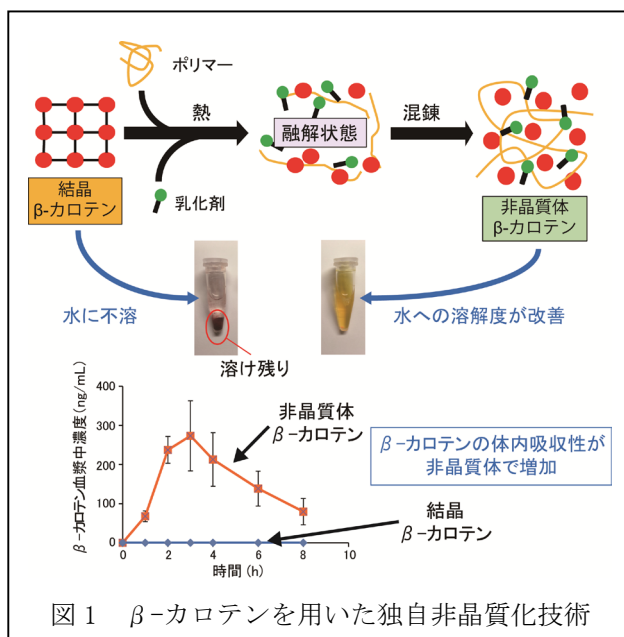


図 1 β -カロテンを用いた独自非晶質化技術

4. 研究成果

(1) 独自非晶質化技術を用いたシリビニン (SLB) 非晶質体の創製

本研究では、NASH の予防効果が期待できる難水溶性ポリフェノールである「シリビニン (SLB)」をモデル化合物とした。まず、結晶 SLB に対して、ポリマーであるポリビニルピロリドン及び乳化剤であるシヨ糖脂肪酸エステルを混合し、二軸エクストルーダーを用いて熱混練を行うことで、SLB の固体分散体を作製した。この固体分散体は、示差走査熱量測定試験 (DSC) による熱動態の分析や粉末 X 線解析 (PXRD) によって、非晶質化していることを確認した。次に、この SLB 非晶質体の水への溶解度を検討したところ、結晶 SLB と比較して 2 万倍以上増大した。これらの事

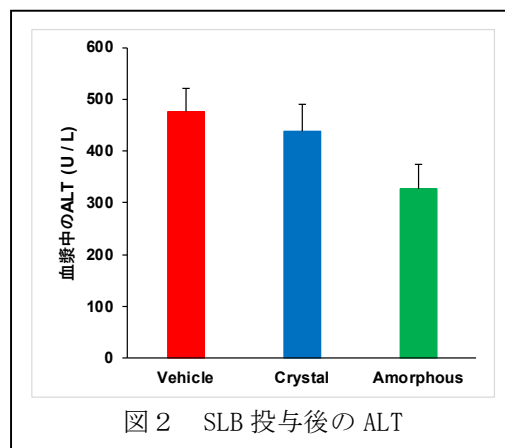
から、水溶性に優れた SLB 非晶質体の作製に成功した。

(2) SLB 非晶質体の体内動態評価

作製した SLB 非晶質体を Wistar ラットに経口投与後、経時的に尾静脈採血し遠心分離後血漿を得た。得られた血漿を前処理し、LC-MS/MS を用いて SLB 濃度を測定した。その結果、SLB 非晶質体は結晶 SLB と比較して、最高血中濃度 (C_{max}) が 200 倍、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-∞}) が 53 倍増大した。更に、SLB を Wistar ラットに静脈内投与し、その血漿中濃度推移情報を得て、バイオアベイラビリティを算出した。その結果、結晶 SLB が 0.2% に対して、SLB 非晶質が 8.6% であった。これらの結果から、SLB 非晶質体は体内吸収性を大幅に改善することが判明した。

(3) SLB 非晶質体の NASH/NAFLD への有効性

SLB 非晶質体が NASH/NAFLD の予防効果を評価するために、超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (MCD) を用いて NAFLD モデルマウスを作製した。投与群としては、MCD 食群、MCD 食+結晶 SLB 群、MCD 食+SLB 非晶質群の 3 群を準備した。そして、SLB を 2 週間毎日経口投与後、最終日に尾静脈から採血を行い、血漿中の肝機能マーカーである ALT (図 2) や AST で評価した。その結果、SLB 非晶質体を投与した際に最も ALT や AST の減少が観察された。従って、SLB を非晶質化することによって、NAFLD を予防する可能性が示された。



(4) SLB 非晶質体の保存安定性の評価

SLB 非晶質体の健康食品開発に向けた基礎情報を得るために、SLB 非晶質体の保存安定性を検討した。作製して 1 年間室温で保管した SLB 非晶質体を PXRD で解析した結果、非晶質体特有のハローパターンを維持していた。よって、SLB 非晶質体が安定な構造を保持し続けることが判明した。

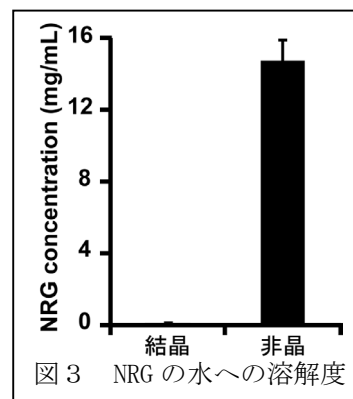
(5) 他のポリフェノール非晶質体を用いた NASH 予防効果の検討

ポリフェノールは、様々な基本骨格を持っている。フラボノリグナン骨格をもつ SLB 以外のポリフェノールについても NAFLD の予防効果が得られるか検討した。難水溶性ポリフェノールとしては、新たにフラバノン骨格を持つ「ナリングニン (NRG)」を選択した。

まず SLB と同様に、NRG 非晶質体の作製を行った。結晶 NRG に対して、ポリビニルピロリドン、及び、今回は乳化剤としてポリグリセロール脂肪酸エステルを混合し、二軸エクストルーダーを用いて熱混練を行うことで、NRG 固体分散体を作製した。そして、PXRD や DSC で分析した結果、NRG 非晶質体であることが確認できた。次に NRG 非晶質体の水への溶解度を測定したところ、結晶 NRG と比較して約 200 倍増大した (図 3)。

次に、SLB の時と同様な方法で NRG 非晶質体の体内動態解析を行った。その結果、NRG 非晶質体は結晶 NRG と比較して、C_{max} が 13 倍、AUC_{0-∞} が 3 倍増大した。また、バイオアベイラビリティを算出したところ、結晶 NRG が 0.5% に対して、SLB 非晶質が 1.4% であった。これらの結果から、NRG 非晶質体においても体内吸収性の大幅な改善が観察された。

最後に、MCD 誘発 NAFLD モデルマウスに NRG 非晶質体を経口投与し、その効果を AST と ALT で検討した。その結果、結晶 NRG と NRG 非晶質の 2 群とも NAFLD に対する抑制効果が観察されないことが判明した。他の評価系であるが、酢酸ライジング法を用いた疼痛モデルにおいて、NRG 非晶質体自体の有効性を証明している。そのため、NRG 非晶質体自体に問題があるとは考えにくい。従って、SLB と NRG の骨格の違いが NAFLD に対する影響に及ぼした可能性の一つとして考えられる。ポリフェノール骨格には、フラボンやフラボノール等の他の骨格が複数存在している。今後、これらの骨格を持つポリフェノールに関しても NAFLD 予防効果を検証し、ポリフェノール骨格と NAFLD に対する効果との相関を検討・考察することで、NAFLD/NASH 予防に最適なポリフェノールを見つけ出していきたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida Takuya, Oki Hiroya, Doi Michihiro, Fukuda Syohei, Yuzuriha Tomohiro, Tabata Ryotaro, Ishimoto Kenji, Kawahara Kazuki, Ohkubo Tadayasu, Miyachi Hiroyuki, Doi Takefumi, Tachibana Keisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural Basis for PPAR Activation by 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine Derivatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64527-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishimoto Kenji, Nakamura Yuta, Otani Shuichi, Miki Shohei, Maeda Soya, Iwamoto Taiki, Konishi Yuma, Ago Yukio, Nakagawa Shinsaku	4. 巻 59
2. 論文標題 Examination of dissolution ratio of β -carotene in water for practical application of β -carotene amorphous solid dispersion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13197-021-04991-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishimoto K., Hatanaka N., Otani S., Maeda S., Xu B., Yasugi M., Moore J.E., Suzuki M., Nakagawa S., Yamasaki S.	4. 巻 74
2. 論文標題 Tea crude extracts effectively inactivate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 2~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakamoto Kotaro, Chen Lu, Miyaoka Tatsunori, Yamada Mei, Masutani Teruaki, Ishimoto Kenji, Hino Nobumasa, Nakagawa Shinsaku, Asano Satoshi, Ago Yukio	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of KS-133 as a Novel Bicyclic Peptide with a Potent and Selective VIPR2 Antagonist Activity that Counteracts Cognitive Decline in a Mouse Model of Psychiatric Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 751587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.751587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tachibana Keisuke, Fukuda Syohei, Fukushima Jun, Ishimoto Kenji, Sakata Masahiro, Nishimori Yasutomo, Doi Takefumi	4. 巻 44
2. 論文標題 Exploring compounds to be used as cosmetic agents that activate peroxisome proliferator activated receptor alpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cosmetic Science	6. 最初と最後の頁 189 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ics.12767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishimoto Kenji, Shimada Yukiko, Ohno Akane, Otani Shuichi, Ago Yukio, Maeda Soya, Lin Bangzhong, Nunomura Kazuto, Hino Nobumasa, Suzuki Masayuki, Nakagawa Shinsaku	4. 巻 9
2. 論文標題 Physicochemical and Biochemical Evaluation of Amorphous Solid Dispersion of Naringenin Prepared Using Hot-Melt Extrusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	6. 最初と最後の頁 850103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnut.2022.850103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishimoto Kenji, Konishi Yuma, Otani Shuichi, Maeda Soya, Ago Yukio, Hino Nobumasa, Suzuki Masayuki, Nakagawa Shinsaku	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppressive effect of black tea polyphenol theaflavins in a mouse model of ovalbumin-induced food allergy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-023-01686-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩本泰樹, 大谷修一, 石本憲司, 吾郷由希夫, 中川晋作
2. 発表標題 機能性食品を指向した非晶質シリピニンの溶解性と消化管吸収
3. 学会等名 日本薬剤学会 第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口拓海, 吾郷由希夫, 山口稜太, 大野茜, 島田有希子, 石本憲司, 大谷修一, 中川晋作
2. 発表標題 ナリングニン非晶質固体分散体による脳内アセチルコリン神経伝達の促進と認知機能低下抑制作用
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小西佑磨, 石本憲司, 大植颯, 大谷修一, 前田壮矢, 吾郷由希夫, 中川晋作
2. 発表標題 茶由来成分エピガロカテキンガレートの抗アレルギー作用に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会年会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石本憲司, 中川晋作
2. 発表標題 機能性食品開発を指向した非晶質 -カロテンの作製とその評価
3. 学会等名 日本薬学会年会 第141年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石本憲司, 中村悠太, 大谷修一, 三木祥平, 前田壮矢, 岩本泰樹, 小西佑磨, 中川晋作
2. 発表標題 -カロテン非晶質固体分散体の実用化を目指した水への溶解率改善に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬剤学会年会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石本憲司, 島田有希子, 大野茜, 大谷修一, 前田壮矢, 吾郷由希夫, 中川晋作
2. 発表標題 機能性食品の創出を目指した非晶質ナリングニンの消化管吸収性と機能性評価
3. 学会等名 第37年会日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口拓海, 片平海雅, 山口稜太, 石本憲司, 樋野展正, 高垣昌子, 大木涉吾, 鈴木壮幸, 中川晋作, 吾郷由希夫
2. 発表標題 緑茶カテキン代謝物EGC-M5はマウスの認知機能障害と抑うつ様行動を軽減する
3. 学会等名 日本薬学会年会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河本茉侑, 石本憲司, 金子瑞季, 樋野展正, 中川晋作
2. 発表標題 機能性食品開発を目指した非晶質化 -カロテンの機能性評価
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院薬学研究科 薬剤学分野
<https://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------