



静岡県立大学 薬学部
薬物動態学分野
助教 佐藤 秀行

共同研究者
大阪薬科大学
製剤設計学研究室
教授 戸塚 裕一
講師 門田 和紀

2004 年 静岡県立大学 薬学部
2008 年 静岡県立大学大学院
薬学研究科 博士課程前期
2010 年 日本新薬株式会社
2014 年 大阪薬科大学
製剤設計学 研究室 助手
2015 年 静岡県立大学 薬学部
薬物動態学分野 助教

機能性食品添加剤を用いた難水溶性ポリフェノールの新規高吸収性/高安定性ナノ粒子設計

研究目的

近年、医療技術の発達に伴い日本国民の寿命は飛躍的に伸び、WHO の報告によると 2014 年現在、日本は世界一の長寿大国となっている。その一方で、少子高齢化が進み、医療費の増大が大きな問題であり、2013 年度の医療費は過去最高の 39.3 兆円にも上った。また、単なる寿命の延長は国家の財源を圧迫するのみでなく、「健康寿命」と平均寿命との差を広げ、国民の生活の質、いわゆる Quality of life (QOL) の低下を引き起こしている。これは、国家及び国民への負担をかけながら「不健康」な余生を過ごしていることを示している。医療費の削減はもとより、老後の QOL 向上を目指すためにも「健康寿命をいかに伸ばすか」は国家の重要な命題となっている。このような背景の下、病院や薬局にかかることなく、健康食品やサプリメントを使用したセルフメディケーションによる健康管理が注目を集めている。健康食品やサプリメント中には多数の有効成分が含有されており、中でもポリフェノール類は抗酸化作用や抗炎症作用を始め非常に多岐にわたる薬理作用を有するため、サプリメントとしての開発が多数実施されている。しかし、これらポリフェノール類の中には水に溶けにくい、つまり消化管においてほとんど吸収されない化合物が数多く存在する。このような難水溶性化合物に対して従来通りの調製技術を用いても基礎物性の改善は望まれず、溶解性及び吸収性の低さのために開発からドロップアウトす

ることが多い。更に、本研究で着目しているクルクミン (CUR) は、溶解性のみならず光安定性が低いことから、より高品質な製品化を目指すには溶解性に加えて安定性改善を含む戦略的な製品開発が必須となる。

難溶性化合物の水への溶解性を改善する手法として、粒子の微細化や固体分散体化による非晶質化などが検討されている。申請者らのグループは、これまでに機能性食品添加物として用いられる糖転移化合物 (糖転移ステビア (Stevia-G), 糖転移ヘスペリジン (Hesperidin-G) 及び糖転移ルチン (Rutin-G)) に着目し、これらが水中において数ナノメートル (<5 nm) のナノコンポジットを形成することを発見し、このナノ構造中に難水溶性化合物を組み込んだ水溶性のナノ複合体を形成することを応用して様々な化合物の溶解性及び吸収性の改善を報告してきた¹⁾。本研究では、これら糖転移化合物を固体分散体制剤の担体として応用することで、高い溶解性と保存安定性を有する CUR 含有の機能性粒子設計を試みる。

方法

CUR 50 mg をエタノール 30 mL、糖転移化合物 (Stevia-G, Hesperidin-G 又は Rutin-G), Polyvinylpyrrolidone (PVP) K-30 または糖転移化合物/PVP K-30 を一定の割合で水 30 mL に溶解させた後に混合し、混合溶液を調製した。その後、混合溶液を凍結乾燥により溶媒留去することで製剤を調製した。調製した製剤は、CUR の溶解度、溶出性及び結晶性 (粉末 X 線回折 (PXRD) ・示差走査熱分析 (DSC)) に関して評価を行った。製剤の安定性を評価するため、熱湿度条件 (40°C/75%RH) で 4 週間保存後における溶出性及び結晶性の評価を行った。また、CUR は光照射による分解が問題となるため、擬似太陽光照射 (Suntest CPS+) 後における残存率を定量し、光安定性試験を実施した。更に、製剤化による経口吸収性の改善を評価するため、CUR 原末 (100 mg/kg) 及び CUR 製剤 (20 mg-CUR/kg) をラットに経口投与後の血中濃度をモニタリングした。

製剤の処方最適化検討

本検討で用いた添加剤中では、Stevia-G-G を添加した製剤で CUR の大幅な溶解性の改善を認めた (Table 1)。この時、添加量の増加に応じて CUR の見かけの溶解度の向上を認め、CUR に対して 10 倍量の Stevia-G を添加することで溶解度は約 1,600 倍にまで増加した (CUR の水に対する溶解度: 0.3 µg/mL)。しかしながら、CUR と添加剤の 2

成分で形成される過飽和状態は非常に不安定であり，24 時間後には 50.9 $\mu\text{g/mL}$ にまで減少した．以前の報告で，過飽和系に対して水溶性高分子を添加することで，相互作用や複合体形成により過飽和状態を安定化することが知られている²⁾．本検討では，3 成分目の添加物として，CUR との相互作用の形成が報告されている高分子である PVP を添加し，CUR の過飽和状態安定化を試みた．PVP K-30 を添加した結果，見かけの溶解度の向上は CUR 原末の約 13,000 倍にまで増加し，24 時間インキュベーション後における溶解度は溶解度試験開始直後の値と比較し，ほとんど減少しなかった．PVP の添加量は，CUR の 0.5 倍量以上の添加では大きく変わらなかったことから，今後の検討では CUR:Stevia-G:PVP K-30=1:10:0.5 で調製し，物理化学的特性評価，光安定性評価及び経口吸収性評価を実施した．

Table 1 Solubility study of CUR samples.

	Ratio	Solubility ($\mu\text{g/mL}$) (water)	
		0 h	24 h (37°C)
<i>Binary system</i>			
CUR:Stevia-G	1:1	N.D.	N.D.
	1:5	3.1 \pm 0.9	0.5 \pm 0.5
	1:10	480.3 \pm 191.4	50.9 \pm 20.3
CUR:Hesperidin-G	1:1	N.D.	N.D.
	1:5	3.1 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1
	1:10	28.7 \pm 2.4	5.9 \pm 0.6
CUR:Rutin-G	1:1	N.D.	N.D.
	1:5	1.2 \pm 0.2	0.9 \pm 0.0
	1:10	10.9 \pm 5.9	2.7 \pm 0.1
<i>Ternary system</i>			
CUR:Stevia-G:PVP K-30	1:10:0.1	3,363 \pm 25.9	3,268 \pm 80.7
	1:10:0.5	4,127 \pm 122.9	3,986 \pm 25.6
	1:10:1	3,963 \pm 64.1	3,268 \pm 46.6
	1:10:2	3,881 \pm 105.2	3,725 \pm 97.1

物理化学的特性評価

製剤化による CUR の溶解性改善を評価するため，溶出液として水を用いた溶出試験を実施した (Fig. 1)．その結果，結晶 CUR は 180 分間の試験でほとんど溶出しなかったが，本製剤は試験開始 3 分にて約 2.4 $\mu\text{g/mL}$ ，すなわち CUR 溶解度の約 8 倍の溶解度を示した．更に，熱湿度条件下で保存後の製剤においてもその溶出挙動はほとんど変化しなかった．

本製剤につき粉末 X 線回折 (PXRD) による結晶性評価を行った結果、結晶 CUR 及び物理的混合物 (PM) では特異的な回折パターンを認め、結晶 CUR の存在を示唆した (Fig. 2A)。一方、3 成分系の製剤では回折ピークは認められず製剤中 CUR は非晶質として存在していることを確認した。更に、示差走査熱分析 (DSC) を使用して詳細な熱動態を分析した (Fig. 2B)。CUR 原末は 188°C 付近に融点に由来する吸熱ピークを認め、PM でも同様のピークを確認した。一方、3 成分製剤では CUR の融点ピークは消失していた。これらの熱挙動は、非晶質固体分散体形成に由来するものであり、CUR に対して Stevia-G 及び PVP を添加して製剤化することで、均一な非晶質固体分散体の形成を確認した。

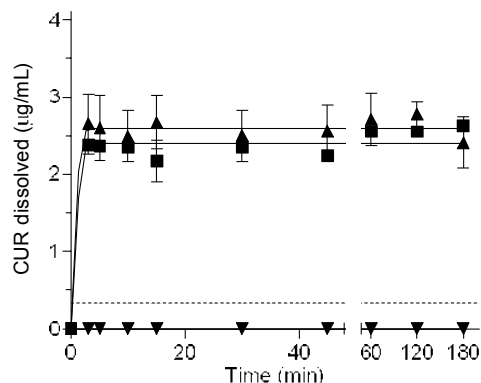


Fig. 1 Dissolution profiles of CUR samples in distilled water at 37°C. ▼, crystalline CUR; ▲, ternary system of CUR/Stevia-G/PVP K-30 (1/10/0.5 w/w) and ■, aged ternary system (40°C/75%RH, 4 weeks). Dashed line exhibits the equilibrium solubility of CUR in water at 37°C (0.3 µg/mL). Each bar represents the mean±SE of 3 experiments.

光安定性試験

CUR を製品化及び臨床応用する上で、溶解性の低さと光安定性の悪さが大きな障壁となる。これまでの検討で、CUR の溶解性に関して改善に成功したが、本製剤の光安定性

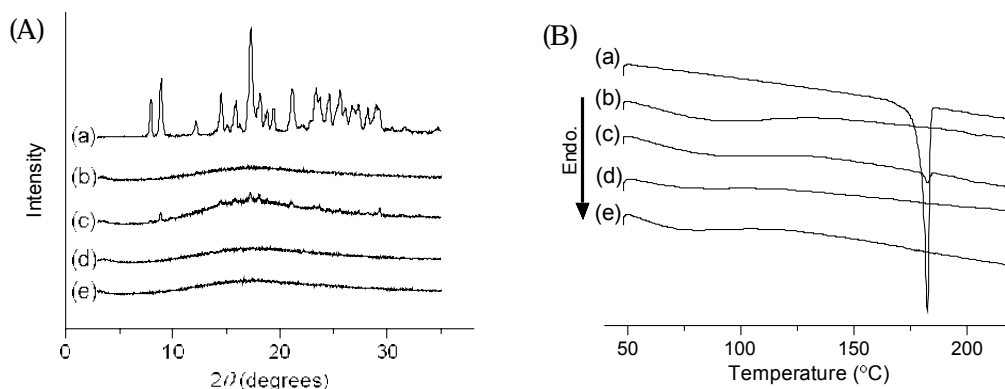


Fig. 2 Crystallinity assessment of CUR samples. (A) PXRD diffractogram and (B) DSC plots of CUR samples. (a) crystalline CUR, (b) Stevia-G, (c) PM, (d) ternary system of CUR/Stevia-G/PVP K-30 (1/10/0.5 w/w), and (e) aged ternary system (40°C/75%RH, 4 weeks).

は明らかとなっていない。そこで、光照射による CUR の分解率を評価するため擬似太陽光を使用した光安定性試験を実施した (Fig. 3)。対象試料として用いた CUR のジメチルスルホキシド溶液は、光照射後の含量が約 30 % にまで低下していた。一方で、結晶 CUR と本製剤の残存率はそれぞれ 98% 及び 90% であった。一般的に、光安定性は溶液状態よりも固体状態、固体状態の中では非晶質状態よりも結晶状態の方が安定である。本製剤は、非晶質状態の CUR を含有しているにも関わらず、CUR の高い残存率を示し結晶状態の CUR とほとんど変わらない光安定性を有していた。

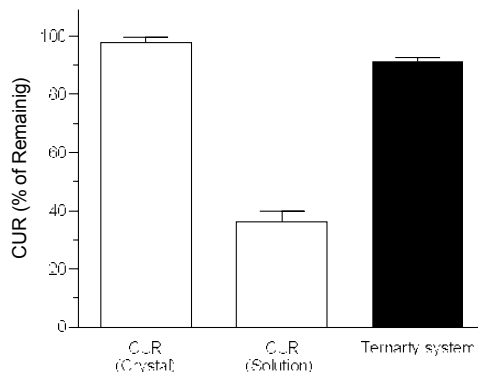


Fig. 3 Photochemical stability of CUR samples. Light-induced degradation of CUR was assayed in crystalline CUR, ternary system of CUR/Stevia-G/PVP K-30 (1/10/0.5 w/w) and CUR solution (DMSO, 1 mg/mL) after exposure to UVA/B (750 W/m²) for 1 h. Data represent mean±SE of 3-4 experiments.

ラットにおける経口吸収性評価

結晶 CUR (100 mg/kg) 及び本製剤 (20 mg-CUR/kg) をラットに対して経口投与後の血中濃度プロファイルから CUR の経口吸収性について評価した (Fig. 4 & Table 2)。結晶 CUR の投与群において、血漿中 CUR 濃度の上昇は非常に限られたものであり、最高血中濃度 (C_{max}) は 35.0 ng/mL、血中濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{0-180min}$) は 3.78 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ であった。一方、製剤投与群においては C_{max} 及び $AUC_{0-180min}$ の値はそれぞれ 86.6 ng/mL 及び 5.06 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ であり、この値から算出した相対的バイオアベイ

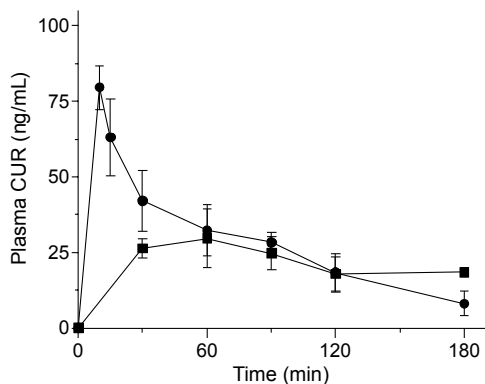


Fig. 4 Plasma concentration-time profiles of CUR in rats after oral administration of crystalline CUR and ternary system of CUR/Stevia-G/PVP K-30 (1/10/0.5 w/w). ■, crystalline CUR (100 mg/kg body weight of rat, p.o.); and ●, ternary system of CUR/SteviaG/PVP K-30 (1/10/0.5 w/w) (20 mg-CUR/kg, p.o.). Data represent the mean±SE of 4-6 experiments.

Table 2 Pharmacokinetic parameters of CUR samples.

	Dose (mg/kg)	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (min)	AUC_{0-180} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)
Crystalline CUR	100	35.0 \pm 8.0	80 \pm 10	3.78 \pm 0.51
Ternary system (CUR/Stevia-G/PVP =1/10/0.5)	20	86.6 \pm 2.9	19 \pm 3.8	5.06 \pm 0.82

C_{\max} , maximum concentration; T_{\max} , time to maximum concentration; AUC_{0-180} , area under the curve of blood concentration vs. time from 0 to 180 min after administration. Data represent mean \pm SEM of 4 experiments.

ラビリティは約 7 倍向上していた。更に、製剤投与群における最高血中濃度到達時間 (T_{\max}) は結晶 CUR の 80 分 から 19 分に短縮しており、より速い CUR の吸収、すなわち薬理効果の発現が速い可能性を示した。これらの吸収性の改善は、製剤化による CUR の溶解性改善に起因するものと推察する。

おわりに

本研究では、難水溶性機能性食品成分である CUR に対して機能性食品添加剤の糖転移化合物を製剤担体として使用し、その溶解性、光安定性及び経口吸収性の改善を試みた。CUR と糖転移化合物の 2 成分系での過飽和状態の維持は困難であったが、3 成分目として PVP K-30 を添加し、相乗的な溶解度改善また過飽和安定化に成功した。本製剤は高い保存安定性、光安定性と経口吸収性を有しており、今後のクルクミン含有機能性粒子開発において、有用な知見となることを期待する。以上の研究成果は、新規性のある内容として現在学術論文に投稿中である³⁾。

謝辞

本研究に支援を頂きました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、当研究に従事して頂いた大阪薬科大学 製剤設計学研究室 戸塚 裕一教授、門田和紀講師に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 92: 49–55, 2015
- 2) *Advanced Powder Technology*: 27, 442–447, 2016
- 3) *Food Chem.*: Submitted.